

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

**LUCIA HELENA BAGGIO MARTINS**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL CAUSADO PELO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE POLPA DE CELULOSE E PAPEL, *in situ*, UTILIZANDO O BIOINDICADOR *Oreochromis niloticus* (TILÁPIA)**

**FLORIANÓPOLIS**  
**2004**

**LUCIA HELENA BAGGIO MARTINS**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL CAUSADO PELO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE POLPA DE CELULOSE E PAPEL, *in situ*, UTILIZANDO O BIOINDICADOR *Oreochromis niloticus* (TILÁPIA)**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.**

**Orientador: Carlos H. Lemos Soares, Dr**

**FLORIANÓPOLIS  
2004**

Dedico este trabalho aos meus pais (*in memorian*) pelo exemplo de dignidade e pelo estímulo dado para estudar sempre mais.

## **Agradecimentos**

Várias pessoas contribuíram para a construção deste trabalho.

Todos foram importantes.

Pelo auxílio no momento exato.

Pela paciência no momento das ausências.

Ao Eliseu, companheiro que sempre acreditou e incentivou minhas atividades, pelo carinho, compreensão, apoio, auxílio e presença em todos os momentos deste trabalho.

À minha querida filha, Gabriela, que, apesar da pouca idade, foi muito compreensiva nas horas de ausência.

Ao meu irmão, Carlos Alberto, cuja ajuda e colaboração permitiram atingir o objetivo final. E aos demais familiares pelo entendimento da necessidade de muita dedicação ao trabalho.

Ao meu orientador, Carlos Henrique Lemos Soares, que me convidou e acreditou na possibilidade do desenvolvimento deste estudo. Pela orientação técnica e explanações ao longo do trabalho. E pela confiança em mim depositada.

À UNIPLAC, que promoveu os recursos necessários possibilitando minha saída para a realização deste estudo.

À Ivana Eunice Baptista e Anabelle Paiva que se mostraram sempre presentes, disponíveis e

carinhosas em todas as etapas deste estudo.

Aos demais colegas, pelo apoio, colaboração e empenho para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Sr. Julio Diniz Alves, Secretário da Agricultura do município de Correia Pinto, que como representante desta Prefeitura, acreditou e participou na execução dos trabalhos.

Ao Pedro Costa e seus familiares cujo apoio e disponibilidade de sua propriedade definiu o sucesso deste trabalho.

Ao Wilian Rafael Veronezi, funcionário do IBAMA, pelo interesse à pesquisa e pelo zelo que teve com os peixes.

Ao Paulo Elias, engenheiro sanitarista e ambiental da Klabin, que colaborou para o andamento desta avaliação.

Ao Prefeito municipal de Lages, Raimundo Colombo, e à Direção do HGMTR por valorizarem este estudo permitindo que eu me ausentasse do trabalho quando necessário.

Aos colegas da UNIPLAC e do HGMTR, que na minha ausência se mostraram sempre presentes.

A todos aqueles que mesmo não tendo seus nomes aqui mencionados, contribuíram de alguma forma para a realização deste estudo.

Pelo apoio moral em várias etapas desse trabalho, a todos vocês, muito obrigada.



“A percepção ecológica profunda reconhece a interdependência fundamental de todos os fenômenos e o fato de que, enquanto indivíduos e sociedades, estão todos encaixados nos processos cíclicos da natureza”.

FRITJOF CAPRA

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
Contextualização .....	01

1.2 Caracterização da Área de Estudo.....	06
1.3 Objetivos.....	11
1.3.1 Objetivo Geral.....	11
1.3.2 Objetivos Específicos.....	11
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Ecotoxicologia.....	13
2.2 Termos utilizados em ecotoxicologia.....	17
2.2.1 Estressor ambiental.....	17
2.2.2 Xenobiótico.....	17
2.2.3 Poluição ambiental.....	18
2.2.4 Biotransformação.....	18
2.2.5 Carga tóxica.....	18
2.2.6 Bioacumulação.....	18
2.2.7 Bioindicador.....	19
2.2.8 Biomarcador.....	20
2.2.9 Biomonitoramento.....	20
2.2.10 Bioensaio.....	21
2.2.11 Biodisponibilidade.....	21
2.2.12 Efeito letal.....	22
2.2.13 Efeito subletal.....	22
2.2.14 Dose e tempo de exposição.....	23
2.2.15 Toxicidade.....	24
2.2.16 Toxicidade aguda.....	24
2.2.17 Toxicidade Crônica.....	25
2.3. Técnicas utilizadas em estudos ecotoxicológicos.....	26
2.3.1 Indicadores moleculares bioquímicos.....	30

2.3.2 Histologia.....	34
2.3.3 Determinações sanguíneas.....	36
2.3.4 Citologia do sangue.....	37
2.4 Peixes como Biomarcadores.....	38
2.4.1 <i>Oreochromis niloticus</i> .....	43
2.5 Produção de polpa de celulose.....	45
2.5.1 Madeira e sua composição.....	45
2.5.2 Processos de Fabricação da Polpa de Celulose.....	48
2.5.2.1 Processos químicos.....	49
2.5.2.2 Processo químico tipo Kraft.....	50
2.6 Estudos com bioindicadores para avaliação dos efeitos de toxicidade do efluente da indústria de polpa de celulose.....	53
2.7 Parâmetros tradicionais para a avaliação da qualidade de águas naturais e efluentes.....	67
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>70</b>
3.1 Sítios de estudo.....	70
3.1.1 Sítios A e B.....	70
3.1.2 Sítio Controle.....	74
3.2 Efluente da indústria de papel e celulose .....	75
3.3 Bioindicador .....	76
3.4 Metodologia de exposição.....	77
3.4.1 Exposição do grupo de peixes referência de laboratório.....	78
3.4.2 Exposição do grupo de peixes controle de campo.....	79
3.5 Coleta e conservação das amostras.....	79
3.5.1 Amostragem dos peixes do grupo referência de laboratório.....	82

3.6 Análise de parâmetros biológicos.....	83
3.6.1 Índice geral.....	83
3.6.2 Análise citológica de sangue.....	83
3.6.3 Análise histológica.....	84
3.6.4 Parâmetros hematológicos.....	84
3.6.4.1 Hemoglobina.....	85
3.6.4.2 Hematócrito.....	85
3.6.5 Enzimas plasmáticas.....	85
3.6.5.1 Aspartato transferase.....	86
3.6.5.2 Alanina transferase.....	86
3.6.5.3 Fosfatase alcalina.....	87
3.6.5.4 Gama glutamil transferase.....	87
3.6.5.5 Colinesterase.....	87
3.6.6 Análise de metabólitos.....	88
3.6.6.1 Glicose.....	88
3.6.6.2 Triacilgliceróis.....	88
3.6.6.3 Colesterol total.....	89
3.6.6.4 HDL-C.....	89
3.6.6.5 LDL-C.....	90
3.7 Determinações físico-químicas.....	90
3.7.1 Temperatura da água.....	90
3.7.2 Condutividade da água .....	90
3.8 Análise estatística.....	91
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>92</b>
4.1 Dados físico-químicos da água no momento das coletas.....	94
4.2 Parâmetros biométricos dos peixes.....	94

4.3 Parâmetros biológicos.....	95
4.3.1 Análise citológica do sangue.....	96
4.3.2 Análise histológica.....	97
4.3.3 Parâmetros hematológicos.....	101
4.3.3.1 Hemoglobina.....	101
4.3.3.2 Hematócrito.....	102
4.3.4 Enzimas plasmáticas.....	104
4.3.4.1 Aspartato transferase.....	104
4.3.4.2 Alanina transferase.....	105
4.3.4.3 Fosfatase alcalina.....	106
4.3.4.4 Gama glutamil transferase.....	108
4.3.4.5 Colinesterase.....	109
4.3.5 Análise de Metabólitos.....	111
4.3.5.1 Glicose.....	111
4.3.5.2 Triacilgliceróis.....	112
4.3.5.3 Colesterol total.....	114
4.3.5.4 HDL-C.....	115
4.3.5.5 LDL-C.....	117
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>
5.1 Estudo da qualidade da água com base em parâmetros físico-químicos.....	119
5.2 Avaliação da qualidade da água com base em parâmetros biológicos.....	123
5.2.1 Testes de toxicidade aguda.....	123
5.2.2 Testes de toxicidade utilizando peixes em gaiolas no Rio Canoas.....	124

5.2.2.1 Comparação entre os resultados do sítio A e sítio B.....	125
5.2.2.2 Comparação entre os resultados do sítio B e os do sítio controle e os do grupo referência de laboratório.....	133
5.2.2.3 Considerações finais.....	141
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>143</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>145</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>146</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Carta hidrográfica Básica do Estado de Santa Catarina. .....	09
Figura 02.	Imagem da indústria de polpa e papel de celulose instalada no município de Correia Pinto, SC.....	10
Figura 03.	Fotografia aérea parcial do município de Correia Pinto, SC.....	72
Figura 04.	Mapa do município de Correia Pinto, ressaltada a região do estudo.....	73
Figura 05.	Ponte da Br 116, sobre o Rio Canoas, no município de Correia Pinto.....	74
Figura 06.	Tubulação de despejo do efluente da indústria de polpa de celulose, no Rio Canoas.....	76

Figura 07.	Imagem da gaiola utilizada no experimento.....	78
Figura 08.	Imagem do local utilizado como laboratório, no sítio B....	82
Figura 09.	Lâminas de sangue do grupo de peixes ( <i>O. niloticus</i> ) do sítio B....	96
Figura 10.	Lâminas de sangue do grupo de peixes ( <i>O. niloticus</i> ) controle de laboratório.....	97
Figura 11.	Cortes histológicos do fígado de peixes ( <i>O. niloticus</i> ), dos sítios A e B.....	99
Figura 12.	Corte histológico do fígado de peixes ( <i>O. niloticus</i> ) do grupo controle.....	99
Figura 13.	Cortes histológicos das brânquias dos peixes dos sítios A e B.....	100
Figura 14.	Corte histológico das brânquias do grupo de peixes controle de laboratório.....	100
Figura 15.	Variação da taxa do hematócrito do grupo dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	102
Figura 16.	Variação da concentração do hemoglobina dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	103
Figura 17.	Variação da atividade enzimática aspartato transferase dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	105
Figura 18.	Variação da atividade da alanina transferase dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	106

Figura 19.	Variação da atividade da fosfatase alcalina dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ) .....	107
Figura 20.	Variação da atividade da gama glutamil transferase dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	108
Figura 21.	Variação da atividade da colinesterase dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	110
Figura 22.	Variação da concentração de glicose dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	112
Figura 23.	Variação da concentração de triacilgliceróis dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	113
Figura 24.	Variação da concentração de colesterol total dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	115
Figura 25.	Variação da concentração de HDL dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	116
Figura 26.	Variação da concentração de LDL dos peixes ( <i>O. niloticus</i> ).....	118



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Datas das coletas e condições de temperatura e condutividade nos sítios A e B.....	94
Tabela 2.	Sumário comparativo dos valores dos parâmetros biométricos avaliados nos peixes ( <i>O. niloticus</i> ) entre o local controle e os sítios estudados.....	95
Tabela 3.	Resultados das análises físico-químicas da água do Rio Canoas no município de Correia Pinto.....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ache	Acetilcolinesterase
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
BMKE	Efluente da indústria de polpa de celulose tipo Kraft
CETSB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Che	Colinesterase
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
ENERCAM	Energia Elétrica de Campos Novos
FA	Fosfatase alcalina
FATMA	Fundação Catarinense de Meio Ambiente
$\gamma$ -GT	Gama glutamil transferase
HDL-C	Colesterol da fração da lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDL-C	Colesterol da fração da lipoproteína de baixa densidade
pH	Potencial hidrogeniônico

## RESUMO

O objeto deste estudo foi a avaliação do impacto ambiental no Rio Canoas, no trecho localizado no município de Correia Pinto, na serra catarinense. Esse rio é receptor de efluentes das indústrias de polpa e papel de celulose da região. Em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) expostos por um período de dois meses em gaiolas a montante (sítio A) e a jusante (sítio B) do local de despejo do efluente, foram analisadas as alterações de parâmetros histológicos (fígado e brânquias), citológicos (sangue), hematológicos (hematócrito e hemoglobina), enzimáticos em plasma sanguíneo (aspartato aminotransferase (ATL), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA),  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) e colinesterase (Che) e metabólitos (glicose, colesterol total, HDL-C e LDL-C). Os resultados demonstraram que: as células sangüíneas apresentaram alterações na membrana plasmática e no núcleo, além da presença de um maior número de eritrócitos imaturos; o fígado e as brânquias apresentaram hipertrofia e sinais de degeneração; a concentração do hematócrito e a taxa de hemoglobina foi superior aos valores do controle e aos de referência de laboratório durante todo o experimento; os metabólitos apresentaram variações indicativas da adaptação dos organismos às condições de exposição ao meio. Os resultados das enzimas avaliadas delinearam alterações compatíveis com danos de exposição crônica, demonstrando serem os peixes bioindicadores eficientes das condições ambientais adversas, observadas neste estudo e que, juntamente com as demais alterações citadas, indicaram a presença de impacto ambiental negativo na região deste estudo.

## ABSTRACT

The aim of this study was the environmental impact evaluation in Canoas River, on the Correa Pinto's part of it, in the ridge of mountains of Santa Catarina. This river is the effluent of the pulp mill receiver of the region. In fishes of the species *Oreochromis niloticus* (tilapia) exposed within a period of two months in jails upstream and downstream of the effluents throwing out area, were analyzed the alterations in the histological parameters (liver and gills), cell (blood), hematological (hematocrit and hemoglobin), enzymatic in blood plasma (alkaline phosphatase (FA), alanine aminotransferase (ALT), asparate aminotransferase (AST),  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) and acetyl cholinesterase (Che) and metabolites (glucose, total cholesterol, HDL and LDL). The results demonstrated that: the blood cells showed changes in the plasmatic membrane and in the nucleus, beyond the presence of a higher number of immature erythrocytes; the liver

and gills showed hypertrophy and degeneration signals; the hematocrit concentration and the hemoglobin rate was superior to the control data and to the laboratory reference during all the experiment.; the metabolites showed indicative variations of the organism adaptation to the environmental exposing conditions. The evaluated enzymes results pointed alterations compatible with the chronic exposure damages, demonstrating that the fishes are efficient bioindicators of the environmental adverse conditions, observed in this study and that, gathering the other alterations mentioned, indicated the presence of negative environmental impact in the region of this study.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Contextualização

Para Reigota (1994), o meio ambiente é um lugar determinado onde os aspectos naturais e sociais mantêm uma relação dinâmica em constante interação e no qual o amplo papel desempenhado pelos corpos hídricos inclui a integração de grandes áreas, que, interligadas, influenciam-se mutuamente. Assim, os corpos hídricos são mais que simples veículos para as mais diferentes substâncias: eles interagem com as mesmas, alterando-lhes as estruturas e modo de ação.

Normalmente, a origem destas substâncias no meio aquático é antrópica e poluente. Heath (1995) aponta como tipos de poluição hídrica a putrefação de matéria orgânica, o excesso de nutrientes, os sólidos suspensos, substâncias químicas tóxicas (metais, cloro, cianetos, amônia, detergentes, ácidos, pesticidas, bifenóis policlorados, hidrocarbonetos do petróleo, efluentes da indústria de polpa de celulose, misturas químicas) e poluição térmica. Ao atingirem o ambiente aquático, as substâncias oriundas da atividade humana estão sujeitas às mais variadas condições físico-químicas e biológicas, cujas ações podem, ou não, transformá-las ao longo do tempo. Segundo Bassfeld (2002), o poder de um determinado agente químico causar efeitos deletérios depende não apenas das suas características, mas também da atenuação ou agravamento desse poder em decorrência das transformações determinadas pelas

condições ambientais.

O grau de contaminação de um organismo depende de alguns fatores, entre os quais, as propriedades físico-químicas da substância química, as rotas de exposição e, ainda, do conjunto de características fisiológicas e bioquímicas do mesmo. Para as espécies aquáticas, as rotas dermatológicas, respiratória e oral são importantes portas de entrada para xenobiontes presentes na água (MALLINS; OSTRANDER, 1994).

Conforme Heath (1995), o entendimento destes impactos nos diferentes níveis de organização biológica, devido às constantes alterações físicas e biológicas nas condições dos ecossistemas, tem sido objetivo da ecotoxicologia.

A concentração de xenobióticos na cadeia alimentar pode constituir uma ameaça direta para os organismos vegetais e animais, assim como para os predadores, incluindo o homem. Para Lemaire e Lemaire (1995), a bioacumulação é mais freqüente e pronunciada no meio aquático. Sua importância depende da taxa de metabolismo e de eliminação dos produtos, considerada em cada organismo aquático.

Para Gonçalves (1998/99), a toxicidade de xenobióticos, presentes no meio ambiente e que prejudicam o desenvolvimento de espécies é, muitas vezes, desconsiderada. Heath (1995) considera que as análises usuais, químicas e físicas da água natural, podem não detectar alterações que estão afetando os organismos aquáticos. Segundo LeBlanc (1995), atualmente os problemas ambientais podem ser mais sutis e não tão evidentes como há alguns anos. Entretanto a ameaça ambiental persiste, causando efeitos de longo prazo, mesmo quando alterações agudas não são percebidas. Cita, por exemplo, que a ausência da mortandade de peixes não justifica o descuido do controle ambiental e falta de apoio às pesquisas, pois ainda que mais difíceis de se visualizar, as conseqüências danosas provocadas ao ambiente por substâncias químicas permanecem (HARTL, 2002).

Embora a evolução e os avanços da química analítica tenham mostrado que não detectado não equivale a não presente ou a risco zero, Gonçalves (1998/99) conclui que a presença do xenobiótico nem sempre pode ser constatada, e que no “Risco Zero” os níveis de substâncias consideradas cancerígenas não são detectadas. Para Vlašiae, Aaso & Bron (2000), o funcionamento alterado dos ecossistemas, da sua estrutura e da sua dinâmica, resulta dos impactos cumulativos sentidos pelos indivíduos e populações.

Segundo Miranda (2000), os padrões de produção e consumo da sociedade atual têm definido tanto o estado das águas, do ar, dos solos, da fauna e da flora, bem como as condições da existência humana. Considera histórica a relação entre o meio ambiente e a saúde das populações, que é alterada de acordo com as diferentes formas de civilização.

A necessidade absoluta de ações de prevenção e manutenção da saúde pública objetivando a melhoria da qualidade de vida das populações em geral, conduz as pesquisas ao vasto universo da toxicologia e culmina com a geração de pressupostos e de regulamentação os quais podem se tornar uma condição elementar e universal para o controle ambiental (GONÇALVES, 1988/99).

Os testes em toxicologia aquática, padronizados em alguns países, estão fundamentados em parâmetros de sobrevivência dos organismos, estado geral e reprodução. Contudo, a tendência pró-ativa vem introduzindo protocolos mais minuciosos que buscam antecipar ou indicar o dano ambiental (WESTER *et al.*, 2002) antes da manifestação de efeitos mais drásticos, como a morte. Para Nascimento (1998), atualmente o enfoque dos programas de proteção ambiental tem como objetivo a proteção e a preservação do ecossistema, diferentemente da forma reativa que repara e restaura o dano ocorrido.

As metodologias que utilizam biomarcadores para avaliar a contaminação aquática têm se mostrado eficientes, pois são sensíveis às alterações de parâmetros biológicos de determinados organismos “sensibilizados” por agentes poluentes. Podem revelar a existência de condições adversas à sobrevivência antes que manifestações clínicas e, portanto, ecológicas, mais drásticas comecem a surgir (THOMAS, 1990; LEHTINEN, 1992).

Assim, a utilização de biomarcadores demonstra ser um forte aliado para a realização do diagnóstico da qualidade ambiental, especialmente quando se considera a exposição subletal (LEHTINEN; TANA, 2001). Esses biomarcadores têm permitido o entendimento dos efeitos das atividades antropogênicas nos ecossistemas. E podem representar a exposição a agentes químicos poluentes, em estudos que avaliam determinantes de efeitos danosos à saúde humana (KOSATSKY; WEBER, 2002).

Desta forma o estudo de alterações biológicas em espécies aquáticas pode gerar dados para que, como em outros países, se componha um banco de dados ecotoxicológicos que complementem as avaliações físico-químicas tradicionais.

Neste sentido a caracterização das condições ambientais da região deste estudo por meio da avaliação das alterações de parâmetros biológicos, dos peixes submetidos à exposição crônica ao lançamento do efluente BMKE, constituiu um segmento do qual também fizeram parte outros dois. Um, que avaliou as condições físico-químicas e a toxicidade aguda da água dos mesmos sítios estudados (PAIVA, 2004). Outro, que realizou o levantamento do estresse oxidativo nos mesmos peixes deste estudo no Laboratório de Ecofisiologia aquática da UFSC.

Neste contexto, apesar dos resultados físico-químicos terem apontado para alterações da qualidade da água, estes não conseguem indicar a presença de danos à biota. A avaliação de toxicidade aguda também não foi suficiente para o diagnóstico de lesões às espécies estudadas. Somente os resultados das determinações de estresse oxidativo apontaram para respostas indicativas da presença de poluentes. Portanto, se existe um dano ambiental não demonstrado por teste de toxicidade aguda, métodos mais sensíveis, como os de toxicidade crônica, devem ser empregados com esta finalidade, embora a legislação brasileira ainda não os contemple. Estes dados e os pressupostos já mencionados constituem a justificativa do presente estudo.

## 1.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EM ESTUDO

A área deste estudo situa-se sobre o aquífero Guarani, e, o Rio Canoas como componente da Bacia do Rio Uruguai, participa na recarga deste manancial aquático subterrâneo. Considerando-se que as condições de potabilidade dos rios que compõem esta Bacia determinarão a qualidade de todo o aquífero, entende-se que a qualidade do Rio Canoas participa diretamente na determinação nas condições deste.

Gomes (1999), no projeto "Uso agrícola das áreas de afloramento do aquífero Guarani e implicações na qualidade da água subterrânea", definiu como objetivo a caracterização do risco de contaminação da água subterrânea por atividades agrícolas nas áreas de afloramento ou recarga deste importante reservatório de água, o Aquífero Guarani.

O município de Correia Pinto, região desta pesquisa, tem uma área de 623 km<sup>2</sup>, situa-se a uma



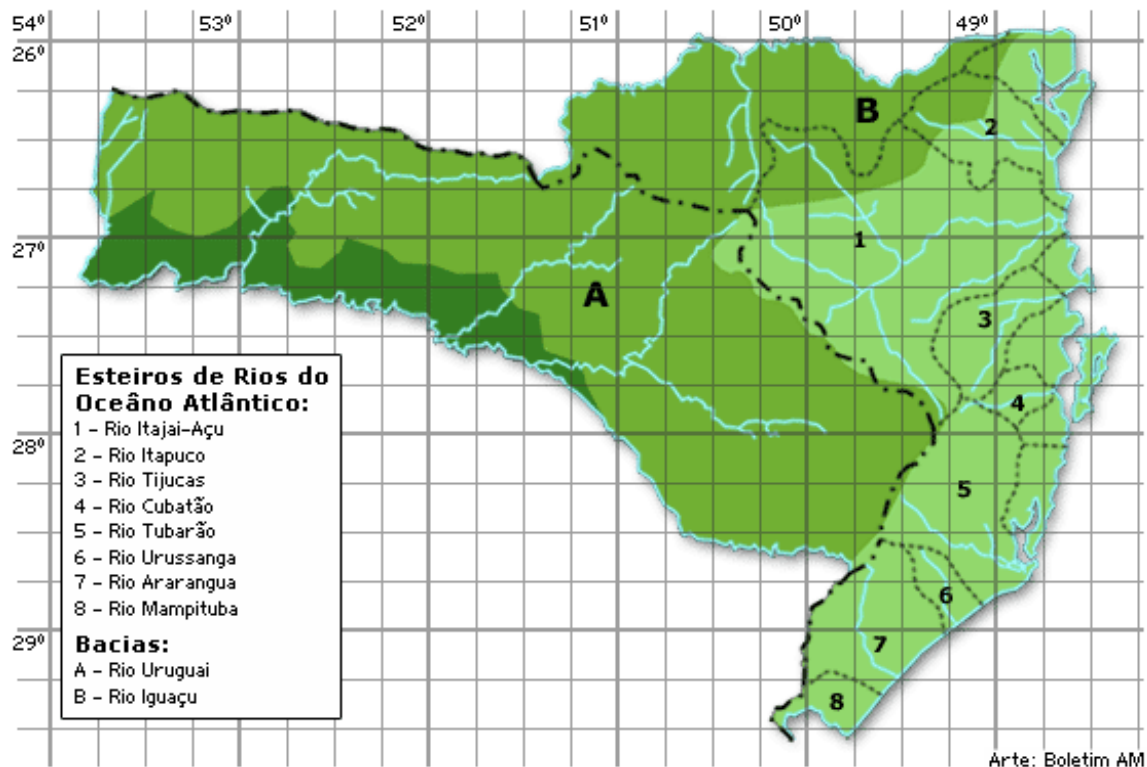
altitude de 850m e esta localizado na microrregião dos Campos de Lages, no Planalto Serrano.

Seu clima é mesotérmico úmido com temperatura média anual de 16°C, precipitação média anual de 1480mm e umidade relativa média anual de 79% (BRASIL CHANEL, 2003). Distante 225km de Florianópolis, tem como cidades próximas os municípios de Lages, Ponte Alta e Otacílio Costa (ESTADO DE SANTA CATARINA, 2003).

Conforme o Censo Demográfico do IBGE de 2000, o município de Correia Pinto tem uma população total de 17.026 habitantes, dos quais 70,75% residem na área urbana e o restante, 29,25%, permanece na área rural. Os dados demonstram um equilíbrio entre a população masculina (50,96%) e feminina (49,04%). Tem uma taxa de alfabetização de 90,7%. Sua classificação, na ordem geral do índice de desenvolvimento social (IDS) do Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, é o seiscentésimo nonagésimo oitavo (698º) lugar (IBGE, 2003).

Localizado às margens da BR-116, o município tem como principal fonte de riqueza a madeira, com extensa área reflorestada. Em Correia Pinto está localizada uma das maiores fábricas de polpa e papel de celulose do Estado e a principal empresa da região. Na agricultura, destaca-se a produção de feijão, maçã, alho e pimentão. Também na pecuária o município marca presença com um grande rebanho bovino de corte e de leite. Correia Pinto possui águas termais e sulfurosas (ESTADO DE SANTA CATARINA, 2003).

O município de Correia Pinto, na região serrana de Santa Catarina é uma das cidades banhadas pelo Rio Canoas, o qual dá origem à maior sub-bacia hidrográfica do Estado de Santa Catarina, a Bacia do Rio Canoas, instituída pela Lei Estadual Nº 10.949, de 09 de novembro de 1998, e que compõe o maior sistema de drenagem da vertente do interior de Santa Catarina. Este rio nasce a uma altitude aproximada de 1.095m, no Campo dos Padres, Serra Geral, no município de Urubici, e banha 12 (doze) municípios entre o Planalto e o Oeste Catarinense. Tem seu curso orientado na direção oeste e ocupa uma área aproximada de 60.123km<sup>2</sup>, equivalente a 63% do território catarinense. Apresenta declividades bastante suaves, variando de 0,01% a 0,03%, ao longo do seu percurso de 567km, entre altitudes de 800 a 850m, em média. Tem uma densidade de drenagem de 1,66 km/km<sup>2</sup>, exibindo uma vazão média de 280 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>, mínima de 110 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> e máxima de 900 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> (BRASIL CHANEL, 2003). No município de Celso Ramos, oeste de Santa Catarina, o Rio Canoas, afluente do Rio Uruguai, conflui com o Rio Pelotas e passa a constituir a Bacia do Rio Uruguai com 49573 km<sup>2</sup> e uma extensão de 2300 km (Figura 01).



**Figura 01. Hidrografia Básica do Estado de Santa Catarina. Fonte: AVULSOS MALACOLOGICOS, 2002. Boletim Informativo do CIEAC. Ano II, no. 14, Marco de 2002.**

Os rios componentes da Bacia do Rio Canoas banham 28 municípios, entre os quais Correia Pinto e Otacílio Costa onde estão localizadas duas das maiores indústrias papeleras do país. Suas águas abastecem mais de 300.000 habitantes e, além do abastecimento doméstico e industrial, são utilizadas para irrigação e, ainda, para a dessedentação de animais. São rios enquadrados nas classes 1 e 2, segundo resolução nº 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 1996).

As principais fontes poluidoras do Rio Canoas na região serrana, são os despejos sanitários, as atividades agrícolas, as atividades de extração de areia e, na área específica desta pesquisa, o lançamento de efluentes da indústria de polpa e papel de celulose (Figura 02). O Relatório de Impacto Ambiental (1990) sobre os efeitos da construção, pela ENERCAM (Energia Elétrica de Campos Novos) da barragem no Rio Canoas, em Campos Novos SC, apontou estar este trecho do rio contaminado por fenóis. Portanto, este é um rio que recebe grande quantidade de xenobióticos em toda a sua extensão (ENERCAM, 1990).

Pelos dados expostos acima, estudos sobre o perfil ambiental e de saúde do município de Correia Pinto, devem considerar principalmente as consequências do lançamento de efluentes da indústria de papel e celulose diretamente no Rio Canoas, pois estudos anteriores demonstraram, em testes de laboratório (SOARES e MOISMANN, 2000), os efeitos deletérios crônicos desses efluentes em

organismos aquáticos.



Figura. 02: Imagem da indústria de polpa e papel de celulose, instalada no município de Correia Pinto - SC.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto ambiental do efluente da indústria de polpa de celulose tipo Kraft, através da exposição crônica da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia), *in situ*, no Rio Canoas, na região do município de Correia Pinto SC, utilizando biomarcadores.

### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.2.1 Avaliar a legitimidade da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) como sentinela da qualidade da água, *in situ*.

- 1.3.2.2. Avaliar o grau das alterações, na espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia), após exposição crônica à água do Rio Canoas, receptor do efluente da indústria de polpa celulósica, utilizando os parâmetros:
- Citológico (sangue).
  - Histológico (fígado e brânquias).
  - Hematológico (hematócrito e hemoglobina).
  - Enzimático (fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase,  $\gamma$ -glutamil transferase e colinesterase).
  - Metabólito (glicose, triacilgliceróis, colesterol total, HDL-C e LDL-C).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 Ecotoxicologia

A Ecotoxicologia é considerada uma subdivisão da toxicologia que estuda os efeitos e a ação de substâncias antropogênicas e naturais nos organismos vivos, em vários níveis de organização, bem como as interações destas substâncias com o meio (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

Os estudos ecotoxicológicos constituem importante ferramenta para o monitoramento ambiental, pois, conforme Meletti (1997), as informações que fornecem a respeito dos ambientes degradados dão subsídios para estudos em outros habitats, auxiliam na avaliação de danos e na identificação da origem dos impactos ambientais. Também ajudam no entendimento das relações entre a poluição e suas consequências biológicas. Buscam ainda, determinar, de forma científica e sistemática, o risco toxicológico resultante da exposição a agentes com propriedades tóxicas intrínsecas, risco esse definido por Gonçalves (1988/99) como a probabilidade de um resultado adverso para a saúde.

A toxicologia aquática é um ramo da ecotoxicologia que avalia os efeitos de xenobiontes em organismos aquáticos. Os primeiros relatos sobre a toxicologia aquática foram traçados no século XVIII e tratam dos efeitos de agentes químicos sobre o organismo. Porém, o primeiro protocolo que incluiu os testes de toxicidade foi estabelecido somente em 1954 pela American Society for Testing and Materials (ASTM) (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

Na década de 60 o toxicólogo Truhaut, conforme Hartl (2002), introduziu o termo toxicologia. No início dos anos 70 a toxicologia foi reconhecida como ciência sendo que neste período foi aceito o uso de peixes como ferramenta para regulamentação governamental e guia para controle da água poluída. Hartl (2002) aponta, também, que a inter-relação entre os estudos dos sedimentos, da bioquímica aquática, da identificação de biomarcadores, de ensaios de toxicidade em micro-escala e da análise de efluentes permitiu o rápido amadurecimento da toxicologia aquática. Porém, somente após décadas, a internacionalização da toxicologia aquática, já aplicada no Canadá e América do Norte, incluiu países da Europa, sudoeste da Ásia, Japão, Austrália, e a Nova Zelândia (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

Conforme Gonçalves (1998/99), o início sistematizado do estudo da avaliação do risco, definido por Casarett e Doulls (2002) como probabilidade da ocorrência de um resultado adverso, deu-se por volta dos

anos 70. Até então, existia pouca regulamentação em alguns países como os EUA, e as regras se traduziam no estabelecimento e vigilância de valores-limite para os trabalhadores e quantidades diárias aceitáveis de resíduos de pesticidas ou de aditivos nos alimentos. A partir daí, foram descritas as diretrizes para a tomada de decisões reguladoras, as quais definiram as regras para a identificação das propriedades tóxicas intrínsecas, avaliação da dose-resposta, análise da exposição e a caracterização do risco, tendo por finalidade fornecer dados de uma forma organizada e consistente para a avaliação do risco. Para Ferolla (2003), o risco é definido como a característica inerente a uma substância, atividade ou procedimento que representa um potencial de causador de danos.

Desde então, a ecotoxicologia se desenvolveu como uma disciplina científica e não só descreve os efeitos da exposição a substâncias químicas e radiação, mas também o destino ambiental de contaminantes (HARTL, 2002).

Na Europa, a resolução dos problemas causados pelas substâncias tóxicas, atualmente, vem sendo considerada como prioridade ambiental. A análise destas substâncias vem ganhando espaço. Castñeira (2000) aponta que das 50.000 substâncias analisadas, 20.000 foram consideradas de efeito nocivo. Alerta, também, que muitas outras estão no mercado sem nenhum tipo de avaliação conforme a Chemical Awareness, em 2000. Cita ainda que a USEPA em 1995 recomendou prioridade para estes testes e indicou uma lista inicial de aproximadamente 87000 substâncias químicas. Destas, planejou que em 1999 fossem testadas 15000.

Para Hartl (2002), estes contaminantes tóxicos freqüentemente causam respostas características nos organismos afetados, as quais podem ser utilizadas como biomarcadores.

A estimativa da toxicidade de águas residuais (domésticas e industriais) com o uso de bioindicadores, conforme Brito *et al.* (2002), tem sido aplicada em muitos países europeus, que têm alterado suas metodologias de avaliação ao adotarem uma abordagem global através de um processo de avaliação direta da toxicidade. Nestes casos, a análise ecotoxicológica das águas residuais constitui a primeira fase do processo analítico.

Rand, Wells e McCarty (1995) consideram que o desenvolvimento e a aplicação de protocolos para estudos ecotoxicológicos constituem importantes ferramentas para o monitoramento ambiental e, no Brasil, ainda são incipientes. As informações obtidas através desta metodologia podem fornecer subsídios para a avaliação de danos crônicos à biota, além de auxiliarem o entendimento das relações

entre a poluição e suas conseqüências biológicas.

Gonçalves (1998/99) avalia que por muitos anos tem havido uma partilha de informações com o objetivo de padronizar o regime de testes químicos e as metodologias dos exames clínicos, indicadores de alterações por substâncias tóxicas. Neste sentido, por exemplo, no Rio de Janeiro (1992), na Conferência das Nações Unidas sobre o ambiente, ficou estabelecido, como um de seus fins, considerar-se a avaliação do risco.

Para Meletti (1997), o diagnóstico da qualidade ambiental sob o olhar da toxicologia permite entender processos biológicos sistêmicos, permitindo somar novas descobertas científicas às metodologias tradicionais. Por conseguinte, o conhecimento dos processos biológicos no controle da poluição e a compreensão das sérias conseqüências no ambiente possibilitam a oferta de subsídios para outras áreas, que dividem a responsabilidade do manejo dos recursos naturais.

## **2.2 Termos utilizados em ecotoxicologia**

Alguns conceitos são fundamentais na ecotoxicologia e aqui são ressaltados aqueles de maior expressão para este estudo.

### **2.2.1 Estressor ambiental**

Estressor ambiental como terminologia usada na fisiologia, refere-se ao agente capaz de causar respostas fisiológicas pelo organismo (HEATH, 1995).

### **2.2.2 Xenobiótico**

Um xenobiótico é definido como uma substância que não tenha sido produzida pelo organismo, tais como produtos industriais, drogas terapêuticas, aditivos para alimentos, compostos inorgânicos entre outros (RAPOSO, 2002). Quando classificado como poluente este é definido como “uma substância presente em quantidades maiores que a concentração natural, como um resultado da atividade humana e

apresenta um efeito de prejuízo à qualidade ambiental” (QUÍMICA E MEIO AMBIENTE, 2003).

Para Hartl (2002), os xenobióticos também são testados para fins mais específicos tais como a citotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade.

### **2.2.3 Poluição ambiental**

É a degradação da qualidade ambiental, com alteração adversa de características do meio ambiente (FEROLLA, 2003).

### **2.2.4 Biotransformação**

Os caminhos de transformação (rotas metabólicas) percorridos pelos xenobióticos no organismo, onde os tecidos os tornam mais polares são denominados de biotransformação. Muitas vezes a biotransformação pode originar um composto metabólito mais tóxico que a molécula original, processo este denominado bioativação. Os compostos bioativados podem produzir lesões ao vencer as barreiras de proteção gerando, no organismo, respostas tóxicas (RAPOSO, 2002).

### **2.2.5 Carga tóxica**

A carga tóxica é definida como a contribuição tóxica do efluente para um corpo receptor (SOARES, 2004).

### **2.2.6 Bioacumulação**

A bioacumulação é definida, de forma geral, como o processo pelo qual os agentes químicos são absorvidos e retidos pelos organismos, a partir do ambiente em que vivem ou através da sua alimentação (SOARES, 2004). A assimilação de um xenobiótico oriundo do meio ambiente, em qualquer tipo de contaminação, pode ocorrer por via oral, respiratória e cutânea, entre outras (CASARETT e DOULLS, 2002).



Os resíduos orgânicos refratários podem sofrer bioacumulação, fenômeno que gera preocupação e também estudos ambientais. Alguns compostos podem estar no meio em concentrações não críticas, porém, pela bioacumulação, sua concentração nos tecidos pode tornar-se elevada e nem sempre os mecanismos metabólicos de eliminação são eficientes (BARROS *et al.*, 1999).

As substâncias antrópicas lançadas às águas podem, pelo fenômeno da bioacumulação, ocasionar diferentes efeitos tóxicos de difícil definição.

### **2.2.7 Bioindicador**

São organismos ou comunidades que podem fornecer informações sobre as condições de um ecossistema. Apresentam processos bioquímicos básicos semelhantes aos do homem e reagem aos poluentes ambientais, com alterações biológicas, mais rapidamente que este (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

### **2.2.8 Biomarcador**

Um biomarcador é conceituado como sendo "... a variação bioquímica, genética, celular, fisiológica ou de comportamento, que pode ser medida em amostras de tecidos, fluidos ou ao nível do organismo inteiro (indivíduos ou populações), de forma a prover evidências de efeitos de um ou mais contaminantes químicos (e/ou de exposição à radiação)" (CASARETT; DOULLS, 2002).

Portanto, biomarcador é uma variação induzida em componentes celulares, bioquímicos, estruturais, mensuráveis em um sistema biológico ou amostra, por efeito de um estressor ambiental (MCCARTY; POWER; MUNKITTRICK, 2002).

### **2.2.9 Biomonitoramento**

O termo biomonitoramento, ou monitoramento biológico pode ser definido como o uso sistemático

de respostas biológicas para avaliar mudanças ambientais com o objetivo de utilizar esta informação em um programa de controle de qualidade. Essas mudanças, normalmente, estão associadas a fontes antropogênicas (SOARES, 2004).

### **2.2.10 Bioensaio**

O bioensaio é definido como sendo um teste usado na determinação da potência de um agente físico, químico ou biológico. Os bioensaios têm sido utilizados na avaliação do impacto de agentes químicos sobre organismos aquáticos, bem como, sobre a qualidade de um determinado corpo de água. Durante as duas últimas décadas, houve esforços para padronização de testes toxicológicos e ecotoxicológicos (microcosmo e mesocosmo), estes testes têm sido, geralmente, reconhecidos como válidos para o controle da qualidade ambiental (BASSFELD, 2002).

Conforme Callisto, 2000, esses testes têm sido utilizados no monitoramento de reservatórios e trechos de importantes bacias hidrográficas sob diferentes níveis de impacto antrópico e como indicadores da qualidade da água e da saúde de ecossistemas.

### **2.2.11 Biodisponibilidade**

Para que um organismo sofra a ação do agente químico, este deve estar biodisponível. A biodisponibilidade é caracterizada pela forma e pela propriedade da substância química as quais lhe permitem interagir com o organismo, provocando o efeito tóxico (SOARES, 2004). A maior ou menor biodisponibilidade determina maior ou menor efeito tóxico.

### **2.2.12 Efeito letal**

O efeito letal é definido como a lesão patológica, causada por um agente, numa concentração

suficiente para que ocorra a morte do indivíduo (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

### **2.2.13 Efeito subletal**

O dano ou a lesão patológica que pode afetar a performance de um organismo ou reduzir a sua habilidade de responder a um estímulo, causado por um agente, numa concentração inferior a aquela determinante da morte, é definido como efeito subletal (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Estressores subletais respondem por um complexo conjunto de alterações fisiológicas, comportamentais, imunológicas e patológicas em peixes. Estas mudanças podem ser observadas no crescimento, na performance de nado, na resistência às doenças e capacidade de reprodução (THOMAS, 1990), entre outros efeitos subcrônicos como a perda de peso, alterações no comportamento e sintomas patológicos (DELICADO; PEREIRA; SANTANA, 1998/1999).

### **2.2.14 Dose e tempo de exposição**

A avaliação da dose-resposta define a relação entre a dose do agente e a probabilidade de incidência de um efeito adverso em animais de laboratório (CASARETT e DOULLS, 2002). Portanto, entender a resposta à dose, relacionada à intensidade e perfil temporal, é a base fundamental do relacionamento quantitativo entre a exposição ao xenobiótico e a incidência de um efeito adverso (GONÇALVES, 1998/1999).

A duração da exposição ao agente em condições experimentais pode ter um considerável impacto na qualidade e quantidade das mudanças fisiológicas (HEATH, 1995).

Se a concentração do poluente for alta, variações fisiológicas rápidas poderão ocasionar a morte, se a exposição do bioindicador for subletal, poderão ocorrer alterações nos padrões do sistema biológico, usualmente após um período de horas ou dias (HEATH, 1995).

Assim, o controle sobre as variantes, dose e tempo de exposição, do bioindicador ao agente químico é um dos aspectos mais importantes para os bioensaios de toxicidade.

Na relação dose / tempo de exposição, os ensaios de toxicidade definem os efeitos de toxicidade

(aguda, subcrônica e crônica), dos xenobióticos.

### **2.2.15 Toxicidade**

Para Soares (2004), toxicidade é a propriedade inerente ao agente químico, que produz efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, por um certo tempo, a determinadas concentrações.

Segundo Quevedo, Bazañez e Barbarin (2001), para determinar a toxicidade empregam-se provas de bioensaio, cujos objetivos consistem em determinar:

1. -A medida de toxicidade aguda ou o limite de tolerância (TLm);
2. -A dose letal capaz de provocar a morte de 50% dos indivíduos (DL50).

Os testes toxicológicos medem, em um animal exposto a um xenobiótico, tanto os efeitos de exposição de curta duração (toxicidade aguda) como os da exposição por longo tempo (toxicidade crônica) (DELICADO; PEREIRA; SANTANA, 1998/99).

### **2.2.16 Toxicidade Aguda**

É a manifestação de um efeito em um curto espaço de tempo (0 a 96h) após a administração de uma dose única de uma substância. Em geral, é o primeiro estudo a resposta de uma substância, realizado quando ainda não se tem nenhuma informação ou somente noções teóricas ou potenciais muito restritas sobre a mesma (SOARES, 2004).

Ensaio de toxicidade aguda têm sido realizados para avaliação da toxicidade de: agentes químicos em geral, águas, efluentes líquidos, lixiviados, lodos e resíduos sólidos. Nestes ensaios são utilizadas várias espécies: peixes, microcrustáceos, algas, bactérias e organismos terrestres (minhocas, plantas e abelhas).

Os resultados desses ensaios são geralmente expressos em CL50 (concentração letal), CE50 (concentração efetiva) ou em outra unidade, de acordo com o estabelecido no método de ensaio.

### **2.2.17 Toxicidade Crônica**

O efeito crônico manifesta-se em organismos vivos expostos a agentes químicos por longos períodos (dias ou anos), conforme o ciclo de vida da espécie em estudo (SOARES, 2004).

A toxicidade crônica caracteriza o perfil toxicológico de uma substância em uma espécie, após uma exposição repetida e prolongada acima de 10 dias. Nas condições deste ensaio, devem se manifestar os efeitos que necessitam de um longo período de latência ou que são cumulativos (MIKAELIAN *et al.*, 2002). Os efeitos crônicos deletérios, na maioria das vezes, ocorrem como resultado de uma exposição a baixos níveis de agentes químicos ou associações destes (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995). A exposição crônica a estressores ambientais pode resultar na diminuição do tempo de vida e do sucesso de reprodução, com sérias conseqüências para a sobrevivência de uma população de peixes (THOMAS, 1990).

## **2.2 Técnicas utilizadas em estudos ecotoxicológicos**

No Brasil, para se avaliar a qualidade da água, tradicionalmente, são utilizados parâmetros físico-químicos tais como DBO, DQO, pH e condutividade, entre outros. Testes de toxicidade que utilizam organismos de vários níveis tróficos têm sido propostos, sendo, porém, restritos à avaliação da toxicidade aguda. A iniciativa de utilizá-los de maneira mais efetiva e sistemática também é bastante limitada, sendo poucos os órgãos como a CETESB/SP que o fazem. Em Santa Catarina, através da FATMA, existe a iniciativa de desenvolver metodologia para a avaliação de toxicidade aguda e propor a sua normatização, contemplando-a na legislação vigente. É necessário ressaltar que a legislação brasileira atual não exige, por parte das indústrias, a realização de quaisquer tipos de ensaios de toxicidade.

Segundo Meletti (1997), as propriedades físicas e químicas dos sistemas aquáticos podem ter efeitos profundos na atividade biológica e sobre xenobióticos. O ecossistema aquático envolve interações físicas, químicas e biológicas complexas, o que torna difícil o entendimento das repostas dos sistemas. A vulnerabilidade dos sistemas aquáticos está relacionada a fatores físicos e químicos, como a duração e tipo de descarga poluente que pode ser aguda ou crônica, intermitente ou contínua (RAND, 1995). Nesse

processo os organismos de água doce têm sido reconhecidos como um grupo sensível a variações de parâmetros ambientais. Contudo os critérios de qualidade da água, obtidos a partir da análise dos organismos, são resultantes, principalmente, de testes de laboratório e, em escala muito menor, de ensaios realizados em campo.

Diferentes laboratórios de ecotoxicologia aquática, no Brasil, como os da UFSC, UFPR, UFSCar e da EESC/USP, vêm desenvolvendo trabalhos de monitoramento da qualidade ambiental em diversos locais com o uso de bioindicadores. Segundo Meletti, (1995), os organismos já padronizados para testes de toxicidade aquática, são as “espécies exóticas *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera), e os peixes *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata*, que têm sido utilizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (CETESB/SP), além das seguintes espécies nativas: *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera), *Chironomus xanthus* (Chironomidae), *Hyalella meinerti* (Amphipoda), *Serrapinus notomelas*, *Serrapinus stenodon*, *Hyphessobrycon eques*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Prochilodus scrofa* (peixes)”. No entanto, poucos são os trabalhos no Brasil que correlacionam a tratabilidade dos efluentes com sua toxicidade (DAMATO *et al.*, 1998).

Os organismos, especialmente os aquáticos, estão sujeitos, em seu hábitat, à exposição a misturas complexas de químicos poluentes. Assim, os bioindicadores podem indicar, tanto em estudos de campo como de laboratório, os efeitos tóxicos resultantes da exposição a misturas de substâncias químicas no ambiente.

Pela sensibilidade das respostas primárias das células a alterações ambientais, os biomarcadores bioquímicos e fisiológicos são apontados como instrumentos eficientes à detecção precoce dos danos causados pela poluição (NASCIMENTO, 1998).

Segundo Walker (1998), para a avaliação ambiental é de grande interesse a análise de biomarcadores que indicam a extensão dos efeitos tóxicos de substâncias químicas em organismos, como, por exemplo, os mecanismos de alterações moleculares resultantes da ação de agentes químicos, tais como a inibição da acetilcolinesterase por organofosforados e carbamatos. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) é amplamente reconhecida como um bom biomarcador de exposição a pesticidas organofosforados (ROEX; KEIJZERS; VAN GESTEL, 2003). Assim, os biomarcadores são ferramentas poderosas para detectar, também, o impacto da exposição a concentrações subletais de uma determinada substância ou de misturas químicas (LEHTINEN; TANA, 2001).

A busca constante para aperfeiçoar ao máximo os resultados obtidos em testes com bioindicadores tem incluído testes *in situ* na avaliação das condições ambientais, e, assim, da qualidade de água e saúde de ecossistemas. Estes testes indicam ser métodos práticos, baratos e, principalmente, confiáveis na avaliação da qualidade ambiental, o que possibilita a comparação entre os padrões de habitats menos afetados com os dos ambientes degradados. A implementação de bioensaios de fácil aplicação pode, num futuro próximo, permitir aos laboratórios fazer da realização de ensaios ecotoxicológicos uma rotina no Brasil (MELETTI, 1995).

Estudos em laboratórios têm sido desenvolvidos para permitir o avanço das investigações sobre a identificação das substâncias químicas específicas envolvidas na etiologia de doenças observadas sob condições onde as variáveis são controladas de forma mais eficiente (WESTER, *et al.* 2002).

Estudos de células e de tecidos, em peixes, têm apontado para uma série de biomarcadores de estresse ambiental. Assim, uma grande variedade de técnicas que utilizam os mais diversos biomarcadores como células isoladas, organelas, sistemas enzimáticos plasmáticos ou tissulares, entre outras, tem sido desenvolvida para o estudo da toxicidade de xenobióticos presentes em efluentes industriais.

Biomarcadores que vêm sendo utilizados em laboratórios ou em estudos de campo: indicadores moleculares bioquímicos, histologia, determinações sangüíneas e citologia do sangue.

### **2.3.1 Indicadores moleculares bioquímicos**

Índices bioquímicos são muito sensíveis aos estressores subletais sendo a magnitude da alteração bioquímica freqüentemente relacionada à severidade de estressores, conforme Livingstone (1985) e Thomas (1987). Mas para Thomas (1990), em geral, há uma falta de informação sobre potenciais indicadores moleculares em peixes.

Respostas bioquímicas em peixes para um amplo grau de adversidades físicas e estímulos químicos (estressores ambientais), têm sido estudadas intensivamente nas últimas décadas. Conforme Thomas (1990), as variações bioquímicas e moleculares são prováveis indicadores de exposição a

estressores ambientais.

Respostas bioquímicas e celulares são indicadoras precoces da exposição a estressores, anteriores ao declínio da população, e apresentam a característica ideal para um indicador biológico: resposta em curto espaço de tempo (THOMAS, 1990).

As respostas fisiológicas causadas pelos estressores são precedidas por alterações bioquímicas ou moleculares, como mudanças químicas nos ácidos nucleicos, células, e fluidos extracelulares (THOMAS, 1990).

Indicadores bioquímicos específicos podem prover informações a respeito da natureza do agente estressor, enquanto que indicadores bioquímicos não específicos indicam conseqüências biológicas de exposição crônica. A associação desses indicadores pode fornecer informações sobre o tipo do estressor, seu mecanismo de ação, a extensão da disfunção fisiológica, e também o potencial das conseqüências em longo prazo (THOMAS, 1990).

Por exemplo, a formação de aductos no DNA é relacionada com a alta incidência de tumores em algumas espécies de peixes expostos a benzopirenos e a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH). Os aductos do DNA são biomarcadores para exposição a PAH e têm sido relacionados à formação de tumores em peixes *Pleuronectes setulus* (WILSON; KRZZYNSKI; ADDISON, 2001).

Das muitas variantes bioquímicas e moleculares que demonstram respostas específicas para certos tipos de estressores ambientais, citam-se as metalotioneínas (THOMAS, 1990), que servem como biomarcadores de exposição a metais. Outro exemplo é a glutatona que geralmente tem sua concentração elevada na presença de metais e contaminantes orgânicos (THOMAS; WOFFORD, 1984; THOMAS; JUEDES, 1992). Também se observa que a vitamina C é deplegada em peixes expostos a doses subletais de substâncias orgânicas e inorgânicas (HEATH, 1995).

As enzimas plasmáticas atuam nas células de tecidos específicos e seus valores aumentados no plasma são indicativos de lesões nestes tecidos. Das inúmeras enzimas e proteínas especializadas que podem ser identificadas nos tecidos, apenas algumas são usadas como biomarcadores. As enzimas plasmáticas de maior interesse indicam danos no tecido hepático e cardíaco. Elas são: a transaminase glutâmica, transaminase oxalacética, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase e sorbitol desidrogenase (HEATH, 1995).



Conforme Lenguen *et al.* (2000), a maioria dos xenobióticos são biotransformados por enzimas localizadas no fígado, embora se tenha demonstrado que as guelras desempenham importante função na biotransformação em peixes. Assim, as oxidases de função mista (MFO), relacionadas a biotransformações de xenobióticos, bem como, ao metabolismo de esteróide e lipídios, são pesquisadas em brânquias e músculos que são tecidos tão apropriados quanto o fígado (HEATH, 1995).

O fígado produz uma série de enzimas oxidativas e redutivas, como o sistema citocromo do CYP450, a flavina-monooxidase, as peroxidases, hidrolases, esterases e amidases, além de outras, como a digluconiltransferase, as sulfattransferases, metilases, acetiltransferases e tioltransferases, que realizam a biotransformação das substâncias absorvidas. Destas, o CYP450 é extremamente sensível para poluentes orgânicos sendo induzido rapidamente.

A indução do CYP450A1 foi observada em hepatócitos de trutas arco-íris (*O. mykiss*) expostas ao fungicida iprodione (CHIESARA *et al.*, 2000). A atividade EROD (etoxiresorrutina-O-detilase) e os níveis de proteína CYP1A foram escolhidos como biomarcadores de exposição aos dibenzo-p-dioxinas policlorados (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs) e a certas bifenilas policloradas (PCBs). A indução do CYP1A, associada ao aumento de aductos do DNA, é considerada como fator de risco para a formação de tumores (WILSON; KRUIZYNSKI; ADDISON, 2001). A atividade EROD hepática tem sido apontada como bom indicador da saúde de peixes na avaliação do impacto no ambiente aquático (WILSON; KRUIZYNSKI; ADDISON, 2001).

A determinação dos níveis de indução do CYP1A em fígado, guelras, rins e cérebro do salmão do Atlântico exposto às bifenilas policloradas e às dioxinas, em laboratório e em campo, mostrou um aumento destes níveis em relação aos do controle, resultado semelhante ao observado em estudos com o fígado do salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) expostos aos mesmos agentes (CAMPBELL *et al.*, 1996).

Algumas substâncias são suspeitas de ocasionarem alterações hormonais e dessa forma afetam a capacidade de reprodução das espécies. Testes demonstraram que o potencial da atividade estrogênica está ligado a respostas biológicas como a disruptura hormonal (PELLISERRO *et al.*, 1993). A atividade hormonal com ação estrogênica e antiestrogênica é constatada em mamíferos e pássaros expostos a pesticidas, hidrocarbonetos policlorados (DDT) e a bifenilas policloradas. Resultados preliminares obtidos com peixes indicam que alguns antiestrogênios podem interferir com ações moleculares de estrogênios

em teleóstolos por mecanismo similar. (THOMAS, 1990).

A introdução de algumas substâncias poluentes na comunidade bentônica pode ocorrer sem nenhuma evidência de efeitos toxicológicos agudos, porém, certos contaminantes (dioxinas, furanos, hidrocarbonetos policíclicos clorados, pesticidas organoclorados e mercúrio) são bioacumulados na cadeia alimentícia aquática e podem desencadear efeitos negativos crônicos, como a disruptura hormonal (TAKATSUKI; YAMAGUCHI, 2001). Neste sentido Pellisserro *et al.*, (1993), citam que a produção de vitelogenina em peixes *in vivo* é indicadora da exposição aos compostos estrogênicos e, primariamente, culturas de hepatócitos têm sido usadas para mensurar a extensão da indução da vitelogenina após a exposição a meios suspeitos de atividade estrogênica.

Outros estudos nossos sobre os efeitos de agrotóxicos em peixes, têm demonstrado alterações, como, por exemplo, a redução da atividade das colinesterases, em peixes coletados no rio Canoas na região da serra catarinense. Também Hussein *et al.* (1996), MOORE e WARING (1998) e Environmental Agency, (1997), citam esse resultado em seus estudos. A exposição aos inseticidas pertencentes aos grupos dos organofosforados e carbamatos é constatada pela inibição das colinesterases. Seu mecanismo de ação é a inibição de enzimas colinesterases, especialmente a acetilcolinesterase, e leva a um acúmulo de acetilcolina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999/2000).

### 2.3.1 Histologia

Os recursos da histologia incluem estudos simultâneos de anatomia, fisiologia, endocrinologia, patologia e toxicologia e podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação e para a identificação do órgão alvo dos compostos tóxicos (WESTER *et al.*, 2002). Embora fatores causais freqüentemente sejam desconhecidos, estudos demonstraram a utilidade da histopatologia como um indicador da qualidade geral do ambiente aquático ao permitir, por exemplo, a realização de um diagnóstico precoce das alterações neoplásicas (WESTER *et al.*, 2002).

A histologia de peixes pode ser útil, tanto em estudos de campo como de laboratório. Em estudos de campo, pode ser usada como ferramenta de monitoramento para a qualidade do ambiente aquático.

Tem se mostrado conclusiva em estudos com peixes selvagens e, mais recentemente, em espécies sentinela, mantidas em gaiolas. Também aponta efeitos adversos indiretos, entre os quais anormalidades da reprodução (WESTER *et al.*, 2002).

O estudo histológico do peixe *Coregonus clupeaformis* de água doce, em Quebec, no Canadá, região com elevado índice de contaminantes, demonstrou a presença de tumores hepáticos e alterações gonadais interpretadas como a masculinização da espécie pelo efeito toxicológico dos poluentes (MIKAELIAN *et al.*, 2002). A histologia confirmou alterações na pituitária em peixes as quais apresentavam inibição: da secreção de hormônios gonadotróficos, da maturação de ovócitos e da modulação da espermatogênese. Outro exemplo onde a alteração é histologicamente demonstrada é a disruptura endócrina em peixes, pela hipertrofia ou hiperplasia do epitélio tireóide (WESTER *et al.*, 2002). Estudos experimentais da contaminação ambiental por resíduo tóxico, com camundongos submetidos à dieta contendo hidrocarbonetos, evidenciam o potencial carcinogênico destes, com o desenvolvimento de tumores hepatocelulares (VISA, 1995).

Segundo Kosatsky e Weber (2002), o valor adicional da histopatologia, neste campo, está na possibilidade da análise e caracterização do mecanismo específico de disruptores endócrinos.

### 2.3.3 Determinações sangüíneas

As análises hematológicas incluem determinações do hematócrito e da hemoglobina, e a contagem de eritrócitos e leucócitos (HEATH, 1995). Além destas, pode-se acrescentar a determinação de metabólitos como a glicose, os triglicerídios e o colesterol, como elementos indicadores de alterações metabólicas em peixes. Os testes de biomonitoramento utilizando o sangue incluem, também, exames da concentração de cloretos, osmolaridade, tempo de coagulação, proteínas totais e proteínas plasmáticas.

O aumento da glicose sangüínea geralmente é um fator indicativo de estresse agudo, como a captura e o manuseio. Apesar de ser sensível à poluição, a glicose apresenta níveis multi-variáveis e não é um bom indicador de estresse crônico (HEATH, 1995).

### 2.3.4 Citologia do sangue

Praticamente todas as doenças que afetam os componentes celulares do sangue podem ser visualizadas na forma de alterações citológicas na morfologia celular ou na forma alterada de distribuição dos diversos tipos celulares (GONÇALVES, 1988/89). A diferenciação celular e a análise do aspecto morfológico das células do sangue são realizadas por microscopia, após coloração do esfregaço de sangue em lâminas.

Os sistemas de reconhecimento de padrões celulares envolvem a coloração de esfregaço sangüíneo (GONÇALVES, 1988/89). No mecanismo de coloração, as porções celulares de pH ácido tendem a se combinar com os corantes de radical catiônico, tanto por adsorção como por reações químicas e o inverso se dá com os corantes de radical aniônico.

Os componentes que reagem com um corante básico são denominados basófilos. Os corantes básicos interagem com os componentes tissulares ácidos, que são os radicais fosfatos dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), os radicais fosfato e carboxila dos proteoglicanos e as carboxilas presentes nos polissacarídeos ácidos (ácido hialurônico) e proteínas ácidas. Enquanto o citoplasma é formado por componentes ácidos e básicos, no núcleo das células predominam os ácidos nucleicos.

## **2.4. Peixes como bioindicadores**

O estado geral, ou integridade biológica, de uma comunidade de peixes é um sensível indicador da saúde relativa do ecossistema aquático e limites aquáticos. Assim sendo, os peixes podem ser usados como indicadores biológicos para indicar a degradação ambiental (KARR *et al.*, 1987).

Peixes são organismos úteis para medir a degradação ambiental por várias razões. Primeiro, os peixes são sensíveis às tensões ambientais de diferentes ordens. Segundo, os peixes denotam efeitos adversos, de tensões complexas e variadas em outros componentes do ecossistema aquático, tal como o habitat, por dependerem destes componentes para reprodução, sobrevivência, e crescimento (KARR *et al.*, 1987). Terceiro, porque peixes têm uma vida relativamente longa, as suas populações demonstram o fracasso de reprodução e mortalidade em idades diferenciadas e conseqüentemente podem ser utilizados como registro de tensão ambiental de longo prazo (KARR *et al.*, 1987). E, ainda, mais diretamente que outras espécies, podem ser usadas comunidades de peixes para avaliar os custos sociais de degradação

porque os valores econômicos e estéticos dos peixes são amplamente reconhecidos (KURT *et al.*, 1990).

Assim, a principal vantagem do uso de comunidades de peixes para indicação da degradação ambiental é que tais comunidades integram os efeitos diretos e indiretos de estresse no ecossistema aquático inteiro e manifestações significativas de perturbação ecológica.

Diferentes espécies de peixes têm sido utilizadas como bioindicadores do ambiente aquático. Determinações fisiológicas, em organismos como os peixes, podem ser utilizadas de três formas no controle da poluição (HEATH, 1990):

ajuda adicional na formulação dos critérios da qualidade da água;

monitoramento da saúde das populações de peixes em campo, prevendo danos que podem levar a sérias alterações na população;

como sensor biológico para detectar súbitas ou inesperadas alterações na qualidade da água, tais como o derramamento acidental ou intencional de tóxicos na água de abastecimento

Muitas populações de peixes selvagens têm demonstrado sinais de alterações de comportamento e redução da capacidade de reprodução devido à contaminação ambiental com substâncias químicas causadoras de disruptura endócrina (ADMS, 1995). Respostas bioquímicas, de peixes, para um largo alcance de adversidades físicas e químicas (estresse ambiental) têm sido estudadas extensivamente. A vulnerabilidade dos peixes aos contaminantes antropogênicos permanece incerta em consequência da deficiência geral de informação sobre a ecologia dos peixes dentro das bacias (SCHINDLER, 1998).

Poucas são as espécies de água doce da região neotropical que têm sua sensibilidade determinada. Surge assim a necessidade da determinação dos níveis tóxicos de diversas substâncias em espécies nativas. Esses dados são de extremo interesse na avaliação de possíveis impactos ambientais provocados por substâncias tóxicas sobre a biota aquática e suas possíveis implicações na preservação do meio ambiente (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

Espécies de peixes pequenos têm sido utilizadas em ensaios de laboratório, para a realização de testes de toxicidade. Usa-se, principalmente no Japão, a espécie *Oryzias latipes*, na Europa, a espécie *Danio rerio* e a espécie *Pimephales promelas*, nos E.U.A.. Ocasionalmente, outras espécies, como a *Poecilia reticulata* e a *Gasterosteus aculeatus*, são usadas (WESTER *et al.*, 2002). Algumas espécies de peixes têm sido testadas no Laboratório da BIOAGRI, no Brasil, entre elas a *Pimephales promelas* e a

*Danio rerio* (BIOAGRI, 2003). Espécies maiores comumente utilizadas são, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a carpa (*Cyprinus carpio*).

As espécies japonesas medaka e guppy são plenamente maduras entre 6 a 15 semanas. Este curto ciclo de vida torna esses organismos um modelo atrativo para estudos de reprodução e aumento da toxicidade na geração progenitora (F zero) e nas gerações subseqüentes (TAKATSUKI; YAMAGUCHI, 2001).

A variedade de espécies testadas tem como vantagem oferecer informações específicas sobre a origem das alterações observadas, embora não haja nenhuma espécie padrão comum a todos os ensaios que ajude a dinâmica das pesquisas (WESTER *et al.*, 2002).

Os estressores subletais elucidam um complexo de alterações do comportamento fisiológico, imunológico e patológico em peixes. Os efeitos mais comuns sobre o comportamento são: a redução do crescimento, da performance de nado, da resistência à doença e da função de reprodução. Desta forma a exposição crônica a estressores ambientais moderados pode resultar na diminuição tanto do tempo de vida de indivíduos quanto da reprodução, com sérias conseqüências, em longo prazo, para a sobrevivência de toda a população (THOMAS, 1990).

Os peixes têm muitas vantagens como modelo experimental nos estudos da disruptura hormonal, pois a base essencial do funcionamento do seu sistema endócrino é similar ao dos mamíferos, apesar da existência de algumas diferenças. (TAKATSUKI e YAMAGUCHI, 2001).

Exemplos apresentados no seminário da Associação Internacional para Pesquisa de Grandes Lagos (IAGLR), por Dewailly *et al.*, (1996) descrevem que concentrações de congêneres de hidrocarbonetos policíclicos clorados de alto peso molecular (PCB) no plasma são correlacionados ao consumo de peixes em regiões ao longo dos Grandes Lagos (KOSATSKY; WEBER, 2002). Pesquisas têm demonstrado a relação da gênese de tumores, em peixes, com a poluição por bifenilas policloradas (PCBs) (WESTER *et al.*, 2002).

Dependendo das características da substância a ser testada, seja no teste de toxicidade aguda, ou seja, nos testes de toxicidade crônica, os ensaios são realizados em sistemas: estático, semi-estático ou em fluxo contínuo.

Os testes toxicológicos com peixes incluem sua manutenção em gaiolas. Os peixes podem ser

mantidos em gaiolas flutuantes (material rígido) ou tanques-rede (material flexível) submersos. Gaiolas ou tanques-rede são estruturas fechadas com tela ou rede que permitem a livre passagem de água ambiente, facilitando a remoção de metabólitos e o fornecimento de oxigênio aos peixes confinados (CONTE, 2002).

O cultivo de peixes em tanque-rede é definido como a criação de peixes em um espaço delimitado com constante circulação de água. São criadouros de tela, de material resistente, com diferentes formatos e tamanhos, suspensos e mantidos em diferentes profundidades.

O cultivo de peixe em gaiola originou-se no Delta do Rio Yangtze há aproximadamente 750 anos (HU, 1994). Porém o cultivo de tilápias em gaiola tem uma história relativamente recente (COCHE, 1974), tendo iniciado por volta de 1970 nos Estados Unidos, com *Oreochromis aureus* (SUWANASART, 1971) e na Costa do Marfim, com *Oreochromis niloticus* (COCHE, 1974). Desde então a técnica tem se espalhado progressivamente por várias regiões do mundo (COCHE, 1974). O sistema de cultivo em gaiola é um método comumente usado na Ásia e América Latina (ALCESTE, 2000).

O cultivo em tanques-rede ou gaiolas pode ser realizado em reservatórios, açudes e lagos. A sua produção pode depender das características físicas e biológicas (dimensão, profundidade, correntes, produção natural de alimento) (IGARASHI, 2003).

As gaiolas flutuantes ou, simplesmente, tanques-rede têm recebido grande atenção nos açudes e ambientes estuarinos, especialmente como uma alternativa para os pescadores, reduzindo parte do período do trabalho dedicado à pesca.

Atualmente, o uso de gaiolas para manutenção de peixes sentinelas foi introduzido em estudos ambientais de campo. Uma das vantagens é a de permitir a escolha do local a ser avaliado, e o controle efetivo sobre a população exposta.

Adams (1995) julga que os peixes podem ser utilizados como sentinelas da exposição a contaminantes ambientais, prevendo efeitos adversos da poluição sobre a saúde humana. Marcadores biológicos podem representar a exposição e os determinantes de efeitos na saúde humana (KOSATSKY; WEBER, 2002).

A espécie *O. niloticus* (tilápia) tem sido utilizada para estudos laboratoriais, na determinação dos efeitos de xenobióticos sobre organismos aquáticos (SOARES *et al.*, 2000).



### 2.4.1 Espécie *Oreochromis niloticus*

Existem cerca de 70 espécies taxonomicamente classificadas de tilápias. As de importância comercial são divididas basicamente pelo comportamento reprodutivo em três grupos: *Oreochromis* (incubam os ovos na boca da fêmea), *Sarotherodon* (incubam os ovos na boca do macho ou de ambos) e *Tilápia* (incubam os ovos em substratos) (IGARASHI, 2003).

As tilápias são descritas como peixes de escamas, com corpo um pouco alto e comprido, atingindo o tamanho máximo de 50 (cinquenta) centímetros (GURGEL, 1998). Sua alimentação pode variar dependendo da espécie podendo ser onívoras, herbívoras ou fitoplanctófagas. Algumas espécies se reproduzem a partir dos seis meses de idade, sendo que a desova pode ocorrer mais de quatro vezes por ano (IGARASHI, 2003).

As tilápias (*Oreochromis niloticus*) são nativas do continente africano e da Ásia menor (Gurgel, 1998). São espécies oportunistas, que apresentam uma grande capacidade de adaptação aos ambientes lênticos. São predominantemente de águas quentes. A temperatura da água do cultivo pode variar de 20 a 30°C, embora possam tolerar temperaturas de aproximadamente 12°C (IGARASHI, 2003). Além de suportar grandes variações de temperatura, toleram baixos teores de oxigênio dissolvido e altos teores de salinidade.

## 2.5 Produção de polpa de celulose

### 2.5.1. Madeira e sua composição

Atualmente mais de 95% do papel é produzido a partir da polpa de madeira. As espécies de madeira mais utilizadas são as da subdivisão *Gymnospermae* denominadas coníferas e/ou resinosas e/ou moles, de fibras longas, e as da subdivisão *Angiospermae* ditas folhosas e/ou não resinosas e/ou duras (SOARES, 2004), de fibras curtas. Como exemplos de coníferas produtoras de madeiras moles podemos mencionar os pinheiros, do gênero *Pinus*, os cedros verdadeiros do gênero *Cedrus*, os ciprestes e as araucárias. Entre as espécies produtoras de madeira dura estão o mogno, jacarandá, andiroba e o



eucalipto (COSTA, 1997). A classificação das madeiras em duras ou moles indica antes tipos de estrutura e composição do que propriedades mecânicas das mesmas (SOARES, 2004). Dá-se preferência ao uso de madeira mole (coníferas) na fabricação do papel, pela característica de suas fibras, que são longas.

A madeira e outros materiais ligno-celulósicos são formados por aproximadamente 90 a 95% de substâncias macromoleculares como celulose, polioses e lignina. O restante é formado por substâncias orgânicas de baixo peso molecular, tais como compostos fenólicos e álcoois, ou inorgânicas. De maneira geral as madeiras são constituídas por quatro componentes principais: celulose, hemicelulose, lignina e os extrativos (SOARES, 2004).

### Celulose

A celulose, polímero linear formado por  $\beta$ -d-glicose, é o componente mais importante, constituindo cerca de 50% da massa bruta da madeira.

### Hemiceluloses

Em geral, as hemiceluloses, polissacarídeos heterogêneos, contidas na madeira, são misturas complexas de polissacarídeos, variando em composição de acordo com o tipo de madeira. Estas polioses, hexoses e pentoses são amorfas e formam cadeias de peso molecular inferior ao da celulose.

### Lignina

A lignina, outro dos componentes da madeira, tem estrutura bem diferente dos polissacarídeos, sendo constituída de um sistema aromático tridimensional. A lignina (20 a 25%) com ação aglutinante das fibras de celulose é um complexo polímero amorfo polifenólico. A composição da lignina e seu peso molecular variam segundo a espécie de madeira empregada (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

Portanto, o que se observa é que, dependendo da sua origem, tipo de madeira ou diferentes partes de um mesmo tecido, a lignina encontrada possui diferentes características estruturais (SOARES, 2004). As fibras vegetais celulósicas em seu estado natural permanecem unidas por diversas substâncias,

principalmente as ligninas. Contrariamente à celulose, a lignina dificilmente é biodegradada (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001), pois a função da lignina é a de, além de conferir força e resistência mecânica à madeira, protegê-la da degradação microbiológica (SOARES, 2004).

### Extratíveis

A madeira também contém produtos químicos extratíveis com solventes. Estes produtos extratíveis variam segundo a espécie de árvore e o lugar onde esta se encontra e constituem entre 5% a 25% do peso da madeira, compreendendo várias classes de produtos químicos (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001), os quais, segundo Soares (2004), incluem uma grande variedade de substâncias com características estruturais bastante diversificadas, tais como ácidos graxos, terpenóides, incluindo resinas ácidas, óleos voláteis, álcoois polihidroxilados, ligninas e flavonóides.

## 2.5.2. Processos de Fabricação da Polpa de Celulose

Na obtenção da polpa celulósica para a fabricação de papel, as fibras da celulose da madeira devem ser separadas de outras substâncias (THOMPSON *et al.*, 2001) não celulósicas. Para isto deve-se extrair a matriz de lignina que as une, mantendo intacta a celulose e, desta maneira, aumentando o rendimento de fibras utilizáveis. A deslignificação das matérias celulósicas fornece a polpa de celulose (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

Há muitos processos e variações de processos básicos para obtenção da polpa de madeira. Alguns funcionam melhor com madeira mole, outros com madeira dura. Assim, a produção de polpa acontece por meios químicos ou mecânicos, ou por combinação destes, já que as fibras podem ser separadas mecanicamente ou por dissolução da lignina através de processos químicos (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

### 2.5.2.1. Processos Químicos

Dos processos químicos, dois respondem pela quase totalidade da produção de polpas no mundo,

os métodos sulfito e o Kraft (SOARES, 2004).

Nestes, o isolamento de fibras de celulose é realizado pelo uso de reativos químicos para dissolver a lignina. Os métodos químicos se dividem em ácidos (Kraft) e alcalinos (sulfito). O primeiro é mais enérgico, gerando papéis de boa qualidade. Tem o inconveniente de não poder ser empregado com madeiras resinosas, pois, com baixo pH, os fenóis e as resinas ácidas se condensam com a lignina formando complexos insolúveis e coloridos que mancham a polpa. Nos métodos alcalinos, ao contrário, essas substâncias são eliminadas na forma de sais, os fenolatos solúveis.

O processo sulfito, tipo alcalino, é assim denominado porque se adiciona  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (sulfato de sódio) no licor de cozimento do processo. No entanto, o cozimento se realiza com uma solução que contém  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaOH}$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , no qual a extração da lignina baseia-se na sulfonação em altas temperaturas (SOARES, 2004).

Destaca-se aqui o processo Kraft, pois o efluente impactante da região em estudo é derivado desta tecnologia de fabricação de polpa celulósica. O processo Kraft predomina em nível mundial e, no Brasil, é o único tipo de processo químico de polpação (SOARES, 2004).

#### **2.5.2.2 Processo Químico tipo Kraft**

O processo Kraft, do alemão, significa forte, resistente, e indica a qualidade que possui este tipo de polpa.

A polpa Kraft, feita com madeira de coníferas, tem as fibras mais longas de todas as polpas, e dá origem a papéis muito resistentes. Pode-se cozinhar todo tipo de madeira pelo processo Kraft e as fibras obtidas são resistentes mecanicamente. As substâncias odoríferas que se desprendem durante o cozimento são grandes contaminantes do ar e difíceis de controlar (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

As etapas fundamentais da produção de polpa química pelo processo Kraft, além do preparo da madeira, conforme a Companhia Pernambucana do Meio Ambiente (CPRH, 1998), são: cozimento, preparo da massa pela lavagem, depuração e espessamento e recuperação de produtos químicos.

Sendo, que o cozimento da madeira, sem a casca e na forma de “chips”, provoca a formação das fibras individuais, do licor negro e os gases da digestão da madeira (CPRH, 1998). Nesta etapa a lignina e

a hemicelulose são retiradas por hidrólise e formam o licor negro, efluente que não é descartado e sim destinado à recuperação de compostos. Deste processo resulta a polpa escurecida, cor derivada da lignina residual oxidada no processo (SOARES, 2004). Daí resulta a necessidade da realização do branqueamento da polpa, para a produção de papéis claros, obtidos em qualquer tipo de processo. Os procedimentos mais novos geram lignina com pesos moleculares de 200 a 1000. Porém a lignina obtida pelo processo Kraft tem um peso molecular de 1000 a 50000 (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

A fase de lavagem tem por finalidade separar, da melhor maneira possível, a polpa celulósica do licor negro (CPRH, 1998). A etapa de depuração serve para separar pedaços de cavacos que não foram devidamente desfibrados (CPRH, 1998). E o espessamento serve para aumentar a consistência da massa que é, posteriormente, enviada ao branqueamento e à máquina de papel (CPRH, 1998).

### Branqueamento

A polpa produzida possui um teor de lignina residual entre 5-10%, que, por reações de oxidação, apresenta uma cor mais escura, conferida também à polpa, dita polpa não branqueada. O tipo de branqueamento é determinado segundo as características da polpa não branqueada, e determina as condições do processo, tais como a quantidade e natureza dos agentes químicos empregados. Esta etapa define as características dos efluentes gerados no processo de polpação (SOARES, 2004).

Os processos de branqueamento são variados, e, às vezes, são necessários tratamentos sucessivos para alcançar o efeito desejado (QUEVEDO, BAZAÑEZ e BARBARIN, 2001). Consistem, basicamente, na remoção das substâncias que conferem cor à massa de celulose. O branqueamento é realizado em três etapas fundamentais (CPRH, 1998):

deslignificação por oxidantes como cloro oxigênio e outros;

tratamento cáustico para remoção das cloroligninas solúveis em álcalis;

branqueamento por agentes fortemente oxidantes como cloro, hipocloritos, peróxidos, dióxidos de cloro, e outros.

O branqueamento é a etapa do processo de produção de papel que provoca a maior preocupação ambiental, pois mais de 3.000 substâncias e produtos químicos são gerados, principalmente no branqueamento convencional em que o agente oxidante mais comum é o cloro elementar ( $\text{Cl}_2$ ) (CPRH,

1998).

Os processos convencionais de branqueamento de polpas utilizam o tratamento com cloro molecular ( $\text{Cl}_2$ ), em adição ao dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e ao hidróxido de sódio concentrado ( $\text{NaOH}$ ). Uma das seqüências mais utilizadas no branqueamento convencional é o tipo CEDE (C= tratamento com  $\text{Cl}_2$ , E= extração alcalina com  $\text{NaOH}$ , D= tratamento  $\text{ClO}_2$ , E= extração alcalina com  $\text{NaOH}$ ). Outra seqüência do tratamento convencional é a do tipo OCEDE (O= tratamento com  $\text{O}_2$ , C= tratamento com  $\text{Cl}_2$ , E= extração alcalina com  $\text{NaOH}$ , D= tratamento  $\text{ClO}_2$ ) (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001). Para Soares (2004), o processo de branqueamento de polpas pelo cloro também gera lignina e derivados, particularmente cloroligninas. E, neste caso, o destino destes subprodutos é o meio ambiente, no qual são despejados na forma de efluentes industriais líquidos.

Outras formas de branqueamento, não convencionais, menos poluentes e mais adequadas à preservação ambiental, podem ser do tipo ECF (Elemental Chlorine-Free) ou TCF (Total chlorine free). O primeiro não utiliza cloro elementar e o segundo grupo, o TCF, não utiliza nenhuma forma de cloro (SOARES, 2004).

Estas tecnologias utilizam agentes alternativos, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ozônio ( $\text{O}_3$ ), o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), e as enzimas lignocelulolíticas, para substituir o cloro e/ou dióxido de cloro (SOARES, 2004). No Reino Unido, estas tecnologias foram introduzidas nos anos setenta, quando, por problemas de mercado e demandas ambientais, os tratamentos tradicionais com utilização de cloro elementar foram substituídos por outros processos de branqueamento, como o ECF (Elemental Chlorine-Free) e o TCF (Total chlorine free), já mencionados (THOMPSON *et al.*, 2001).

## **2.6 Estudos com bioindicadores para avaliação dos efeitos de toxicidade do efluente da indústria de polpa de celulose**

Na conversão da madeira a papel, a indústria de polpa produz altos níveis de poluentes do ar e da

água, e requer mais água que qualquer outro processo de produção. A composição química e a toxicidade dos efluentes são largamente dependentes de alguns fatores que incluem tanto as tecnologias de processamento (cozimento, lavagem, branqueamento, etc.), como as do tratamento final dos efluentes (VLAŠIAE; AASO; BRON, 2000). Portanto, a indústria de polpa tipo Kraft é responsável pela descarga volumosa de efluentes altamente poluidores. As características principais deste efluente são a alta toxicidade e a baixa biodegradabilidade devido aos taninos, à lignina e a combinações de clorofenóis (DIEZ; VIDAL; VIDE LA, 2001).

Historicamente, o efluente da indústria de polpa e papel é mundialmente considerado poluidor, particularmente de ecossistemas aquáticos que impõem conseqüências de longo prazo em todos os níveis de tróficos. Pesquisas de Woin (1995), Owens (1990) e Södergren (1993), sugerem que os efluentes de indústrias de polpas afetam os ecossistemas em sua estrutura, função e dinâmica. Conforme Vlašiae, Aaso e Bron (2000), os efeitos ecotoxicológicos podem atingir indivíduos e / ou populações e ecossistemas.

No ambiente aquático, os compostos presentes no efluente da indústria de polpa são distribuídos entre o sedimento, a biota e a coluna de água. Assim, os impactos ocorrem em todos os níveis tróficos do ambiente aquático e afetam a flora e a fauna da coluna de água (VLAŠIAE; AASO; BRON, 2000). Cada sistema aquático tem uma dinâmica que permite a ocorrência de complexas interações entre os componentes bióticos e abióticos, incluindo a água, os substratos, o sedimento e a matéria em suspensão (RAND, 1995).

Indústrias de polpas celulósicas são uma das fontes antrópicas de maior demanda de oxigênio inseridas no ecossistema aquático. E essas indústrias, para reduzir a carga de poluentes, adicionam nutrientes, tais como, uréia e ácido fosfórico, para melhorar o processo de tratamento dos efluentes. Assim, estes efluentes contêm vários nutrientes, além de contaminantes, e alteram o meio de diferentes formas (WAYLAND *et al.*, 1998).

Qualquer nutriente em excesso, quando introduzido no ambiente aquático, pode contribuir para o aumento do consumo de oxigênio dissolvido na água. O efeito cumulativo ou o aumento do aporte de nutrientes para os sistemas é atualmente desconhecido e requer investigação adicional (SCHINDLER, 1998). Esse excesso pode resultar da ineficiência do processo de tratamento do efluente (THOMPSON;

SWAIN; FORSTER, 2001).

Os compostos presentes nos efluentes da indústria de polpa são transportados ao longo dos ecossistemas, através da água, dos sedimentos e em organismos, devendo-se considerar os efeitos globais destes contaminantes (VLAŠIAE; AASO; BRON, 2000). Durante o transporte, esses efluentes sofrem degradação ininterrupta, o que altera sua composição e diluição e, conseqüentemente, deduz-se que os contaminantes tenham seus efeitos diminuídos com o aumento da distância a jusante da fonte de lançamento (SÖDERGREN, 1993). Assim, as respostas do ecossistema, como mudanças graduais no tamanho de população, o número e tipo de taxa, e biomassa global deveriam imitar esta diluição de efeitos por espaço (SÖDERGREN, 1993). No entanto, Förlin *et al.*, (1991) apontaram a elevação da atividade EROD como conseqüência do efluente da fábrica de polpa em peixes coletados até a 40km do ponto de descarga. Hodson *et al.* (1991) encontraram a atividade de oxigenases de função mista (MFO), significativamente reduzida, em peixe white sucker (*Catostomus commersonii*) a 95 quilômetros a jusante do lançamento do efluente da indústria de polpa em um ecossistema fluvial. Níveis significantes de substâncias oriundas do efluente de polpa de celulose foram encontrados por Soimasuo, (1997), numa distância maior que 16km a jusante do lançamento do efluente de polpa. Södergren (1993) indicou impacto na fauna bentônica, no Mar Báltico, em pontos distantes 27km a jusante da indústria de polpa. Também o tricloroguaiacol foi identificado em sedimento a 150km do ponto de lançamento deste efluente (SÖDERGREN *et al.*, 1989) em toda a sub-bacia do Mar Báltico. Martinsen *et al.* (1991) detectaram níveis de tricloroguaiacol a aproximadamente 30km a zona de descarga de efluentes da indústria de polpa.

Componentes adsorvidos ao sedimento são liberados conforme características físico-químicas e biológicas da interface sedimento/água. Os sedimentos podem ser carcinogênicos, mutagênicos ou ter outro potencial tóxico.

A água intersticial dos sistemas aquáticos pode ter efeitos profundos na atividade biológica e no impacto de xenobióticos (RAND, 1995). Os meios de contaminação que implicam na presença de materiais suspensos, dissolvidos ou em alterações bioquímicas não são necessariamente isolados, mas normalmente simultâneos.

Os sedimentos podem servir como fonte secundária para muitos contaminantes persistentes e seu potencial para causar danos afeta ecossistemas bentônicos (WESTER *et al.*, 2002). Considerando que o ecossistema aquático envolve interações físicas, químicas e biológicas complexas (RAND, 1995), a

detecção de moléculas poluentes pode tornar-se uma tarefa árdua e nem sempre exata, já que esses corpos são passíveis de sofrer alterações que dificultam sua identificação.

A re-suspensão das substâncias pela turbulência e pela atividade antropogênica representa alguns dos meios físicos de disponibilizar os contaminantes adsorvidos nos sedimentos e de re-introdução destes na água (LEHTINEN; TANA, 2001), tornando-os biodisponíveis. Conforme Hodson *et al.* (1991), a re-suspensão do sedimento potencializa o impacto ambiental negativo, causado por dioxinas, furanos e outras substâncias acumuladas no sedimento.

Vários estudos com espécies aquáticas têm sido desenvolvidos na tentativa de avaliação do impacto causado pelos efluentes da indústria de polpa celulósica. Para tanto, muitos programas utilizam marcadores biológicos de exposição e têm como objetivo principal a caracterização de contaminantes em um grupo de população particular (KOSATSKY; WEBER, 1998).

Uma análise do litoral espanhol, em Pontvedra, concluiu que o efluente da etapa de branqueamento da polpa de celulose, com cloro e derivados, é uma das contaminações mais perigosas, e persistentes que se acumula no ambiente (CASTÑEIRA, 2000), razão pela qual os efluentes resultantes do branqueamento constituem o problema mais grave para a indústria de polpa e papel.

Em grande parte do processo a água é contaminada com os subprodutos e resíduos das etapas de produção da polpa. A etapa de branqueamento da polpa, na forma convencional, requer grandes quantidades de água. Assim, a etapa de branqueamento é o contribuinte mais significativo à carga de poluição global e forma 50-75% do volume do efluente (UNEP, 1998). Dentre as centenas de substâncias químicas diferentes, identificadas em efluentes da fase de branqueamento com cloro elementar, citam-se as frações de baixa massa molecular que são os agentes químicos responsáveis pela toxicidade deste tipo de efluente. As principais substâncias apontadas como de alta toxicidade nestas frações são os clorofenóis, cloroligninas, ácidos orgânicos, resinas ácidas, dioxinas e seus derivados (SOARES; MOSIMANN, 2000).

Muitos destes compostos apresentam grande resistência à degradação biológica e química que, associada à natureza hidrofóbica dos mesmos, potencializa os efeitos tóxicos via efeito de bioacumulação (SOARES; DURÁN, 2001).

Dentre estes compostos, as ligninas, os estilbenos, as resinas ácidas e os esteróides/álcoois triterpenos contêm estruturas individuais com atividade endócrina demonstrada. Alguns destes



componentes só apresentam atividade endócrina depois da transformação microbiana, como, por exemplo, metabólitos das resinas ácidas, ocorrida em ambientes anaeróbicos, como no interior anóxico dos sedimentos (LEHTINEN; TANA, 2001). Assim, em ambientes aquáticos, onde os sedimentos podem acumular compostos clorados, especialmente os clorofenóis, a investigação dos efeitos biológicos decorrentes de bioacumulação via cadeia alimentar são de extrema importância (CARLBERG *et al.*, 1987; TALKA; PRIHA 1987).

Provavelmente, as resinas ácidas, pela presença do ácido desidroabiético, componente natural de resinas ácidas extraídas de madeira mole, são as substâncias mais tóxicas do efluente da indústria de polpa (OWENS, 1991). Apesar de muitas resinas ácidas serem facilmente biodegradáveis, alguns de seus componentes, como o ácido desidroabiético, foram identificados em sedimentos. Por exemplo, Tavendale *et al.* (1996) demonstraram que estas resinas ácidas não foram suficientemente degradadas no sedimento em um período de tempo de 40 anos (LEHTINEN; TANA, 2001). Segundo Heath (1995), o ácido desidroabiético também é um dos componentes mais tóxicos deste tipo de efluente. Este ácido foi o composto encontrado em maior quantidade (26 a 53%), na área de estudo com a espécie *Salmo gairdneri* (truta arco-íris) receptora do efluente resultante do emprego de cloro elementar na etapa de branqueamento da polpa de celulose (OIKARI; KUNNAMO-OJALA, 1987). Resultados de pesquisas sobre a toxicidade do ácido desidroabiético concluíram que este causa interferência na produção da energia celular em hepatócitos do fígado de trutas arco-íris, nos quais se observou a redução acentuada da concentração celular de adenosina trifosfato (ATP), e da glicólise celular (RISSANEN; KRUMSCHANABEL; NIKINMAA, 2003).

Para Södergren (1993) a maior parte dos efeitos tóxicos causados pelo efluente da indústria de polpa são irreversíveis, especialmente os genotóxicos.

A capacidade mutagênica de compostos presentes neste tipo de efluente, como cloroguaiacóis e clorocatecóis, é bem estabelecida (KRINSTAD; LINDSTROM, 1984). Em bactérias expostas ao efluente de fábrica de polpa tipo Kraft, os resultados do teste de Ames, com linhagens da *Salmonella typhimutium*, demonstraram que os efluentes do primeiro estágio de branqueamento das indústrias de papel tipo Kraft e também da indústria quimio-termomecânica são potenciais geradores de mutagenicidade. No teste, tanto seqüências com 100% de cloro como as com substituição de cloro por dióxido de cloro ou, ainda, seqüências totalmente livres de cloro apresentaram atividade variada de efeito

mutagênico (ROSA, 1997).

Na Europa, estudos evidenciaram a participação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de alto peso molecular (PAHs) na etiologia de neoplasmas e lesões hepáticas, em peixes (WESTER *et al.*, 2002).

Estudos nos laboratórios da UFSC demonstram alterações histológicas de tecidos de tilápias expostas ao efluente BMKE diluído. Entre as alterações foram observadas: a hiperplasia das brânquias com fusão lamelar e a hiperplasia do tecido hepático que também apresentou muitos vacúolos e no qual as células manifestaram sinais de perda de material intracelular além da presença de vacúolos ou de alterações da membrana nuclear (SOARES; BAPTISTA, 2002).

Várias pesquisas têm apontado correlações entre a exposição aos organoclorados e certas formas de câncer, problemas neurológicos e, mais conclusivamente, alterações do sistema hormonal e, conseqüentemente, na reprodução de espécies aquáticas e humana, pelos EDCs (endocrine-disrupting chemicals) (QUEVEDO; BAZAÑEZ; BARBARIN, 2001).

Estudos sobre a disruptura hormonal em peixes sugerem que combinações de misturas químicas complexas, que respondem por alterações em parâmetros da reprodução de peixes, estão presentes em efluentes de polpa Kraft branqueada (LEHTINEN; TANA, 2001). Além destas alterações, também se demonstrou a capacidade de estas misturas químicas provocarem mudanças da homeostase hormonal, em tilápias (KENDALL *et al.*, 1998) e trutas expostas, sendo, portanto, denominadas disruptores hormonais (MELLENEN *et al.*, 1996).

As resinas ácidas são consideradas intensamente tóxicas aos peixes, sendo que estudos demonstraram que o extrato do ácido abiético produziu efeitos estrogênicos quando testado em cultivo de células (MELLANEN *et al.*, 1996).

O risco de exposição ambiental a combinações de substâncias com atividade endócrina, vem aumentando (TYLER *et al.*, 1998). Pesquisas com peixes de bacias hidrográficas, do norte do Canadá, confirmaram a presença de níveis elevados de dioxinas, furanos e congêneres no ciclo alimentar imediatamente a jusante do lançamento de efluente da indústria de polpa celulósica tipo Kraft branqueada (SCHINDLER, 1998).

Nestes estudos ecotoxicológicos foram utilizados um conjunto de biomarcadores que demonstraram

sinais de tensão ambiental em peixes. Os peixes capturados a jusante das indústrias de polpa de celulose exibiram freqüências mais elevadas de anomalias físicas (escoriações, lesões, tumores, e outras) além de níveis reduzidos dos hormônios sexuais. Também foram detectados números mais elevados de peixes com atraso da maturidade sexual entre os capturados imediatamente a jusante das indústrias de polpa (SCHINDLER, 1998). A indução de oxigenases de função mista (MFO), alterações dos níveis de esteróides sexuais, aumento do índice hepático, redução do grau de crescimento, mudanças das condições do organismo, diminuição da reprodução e demora da maturação sexual também foram citadas por Wayland *et al.* (1998), em estudos semelhantes.

Outros autores também constataram uma variedade de respostas semelhantes, tais como o atraso da maturidade sexual, gônadas menores, alterações na reprodução dos peixes e a diminuição das características sexuais secundárias, em populações de peixes vivendo a jusante do despejo de efluente da indústria de polpa de celulose tipo Kraft (MUNKITTRICK *et al.*, 1997). Walker (1998), além da indução hepática das oxigenases de função mista (MFO), também apontou a presença de alterações na reprodução, como a redução de níveis de esteróides na circulação, a redução do índice somático e gonadosomático, a diminuição do tamanho dos ovos/óvulos, a diminuição da expressão das características sexuais secundárias e da idade de maturidade.

Estudos de campo para avaliação de respostas endócrinas e de reprodução com o peixe white sucker (*Catostomus commersonii*) exposto ao efluente de indústria de polpa tipo Kraft alvejada, em Jackfish Bay, no Canadá, demonstraram que estes peixes exibiram uma variedade de respostas, tais como alterações na reprodução com atraso da maturação sexual, redução da fecundidade (gônadas de fêmeas), decréscimo do tamanho, expressão reduzida de características sexuais secundárias (em machos), redução plasmática de níveis de esteróides sexuais e de gonadotropina (MUNKITTRICK *et al.*, 1992, MCMASTER *et al.*, 1996).

Para Vethaak *et al.* (2002), níveis alterados de vitelogenina (VTG) plasmática em peixe macho foram compatíveis com as alterações histomorfológicas das gônadas. Avaliações realizadas por Myers *et al.* (1990) constituem outro exemplo do uso de peixes como ferramenta de monitoramento, onde a disruptura endócrina é originada por substâncias químicas.

Outras avaliações de impacto cumulativo nestas Bacias do Canadá demonstraram níveis elevados

de contaminantes em sedimentos do Rio Athabasca, especificamente após o despejo de efluente das indústrias de polpa. Nesse local a frequência de deformidades físicas em peixes e outras espécies aquáticas é elevada e mudanças são percebidas pelo declínio da quantidade e da qualidade dos peixes da região. Contudo, as implicações de exposição em longo prazo para concentrações subletais ainda são desconhecidas (SCHINDLER, 1998).

Na Suécia, nos anos oitenta, foram demonstradas alterações no crescimento e na reprodução de peixes expostos a efluentes de fábricas de polpa celulósica (SANDSTRÖM *et al.* 1988).

O estudo com a espécie *Percopsis omiscomaycus* (truta arco-íris), no Canadá, coletada no local de lançamento de efluente da indústria de polpa de celulose, demonstrou que os peixes, em relação ao local de referência, apresentaram-se menores, com menos peso e longevidade reduzida em dois a três anos (GIBBONS *et al.*, 1998). Outros pesquisadores apontam como resultados desta exposição o aumento do nível de certas oxidases hepáticas, o desenvolvimento irregular ou atrofia de gônadas, a maturação sexual irregular e comprometimento da reprodução, a deformação vertebral em peixes, alterações morfológicas em células sangüíneas e nível de esteróides sangüíneos, acrescidos de modificações fisiológicas e histopatológicas (OWENS, 1991; MUNKTTRICK *et al.*, 1992; PEDROSA *et al.*, 1997). Além desses, o aumento da atividade hepática da uridina difosfato (UDP-GT) foi observado após 15 dias (quinze) de exposição da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), a 11Km do ponto de lançamento do efluente da indústria de polpa tipo Kraft (BKME). Na Finlândia, obteve-se resultado semelhante em estudos com a *Perca fluviatilis* (truta européia) coletada a jusante do despejo deste tipo de efluente (ANDERSSON *et al.*, 1998), assim como em exposições a baixas concentrações.

Poluentes como as bifenilas policloradas e as dioxinas são consideradas indutoras do CYP1A. A determinação dos níveis de indução do CYP1A em tecidos do fígado, guelras, rins e cérebro do salmão do atlântico exposto a poluentes em laboratório e em campo mostrou aumento em relação ao controle, resultado semelhante ao do estudo do fígado do salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposto às mesmas substâncias (REES *et al.*, 2003).

Distúrbios nos eritrócitos e na função hepática foram constatados em peixes expostos à resina ácida, apresentando sintomas como a icterícia, falhas na produção da hemoglobina e o acúmulo de

bilirrubina no sangue (RISSANEN; KRUMSCHANABEL; NIKINMAA, 2003). Também os aspectos morfológicos das células sanguíneas de *O. niloticus* apresentaram padrões alterados após exposição subletal ao efluente de polpa de celulose, em testes de laboratório (HEATH, 1995). Outros estudos sobre os efeitos hematológicos, após a exposição crônica ao BMKE, apontaram a presença de anemia em salmão (MCLEAVY, 1976) e o aumento do tempo de coagulação (IWAMA *et al.*, 1976). Para Heath (1995), a toxicidade do ácido dehidroacético foi relacionada à ocorrência de icterícia por anemia hemolítica em peixes. Em trutas, *in vitro*, a resina ácida foi indicada como a causa da redução da produção de ATP celular e do consumo de oxigênio, além do aumento da hemólise (HEATH, 1995). Esta exposição também foi associada com o aumento de agregados pigmentados em macrófagos no fígado, rins e baço de peixes, prejuízos na reprodução, lesões patológicas, mortalidade de peixes juvenis, distúrbios de crescimento e alterações bioquímicas (HOLOWENKO, 2001-2002).

Conforme Kruzynski, Wilson e Addison (2001), peixes expostos ao efluente de polpa tipo Kraft branqueada têm manifestado uma série de alterações tais como aumento da atividade do CYP1A, alterações sangüíneas, aumento dos índices somático e hepático, alteração dos níveis de esteróides, mudanças no sistema reprodutor, aumento da ocorrência de aductos no fígado e outras lesões. Respostas observadas em indivíduos juvenis da espécie *Oncorhynchus tshawytscha* (salmão) expostos, em laboratório, ao efluente diluído, oriundo de fábrica de polpa de celulose branqueada com cloro elementar, indicaram aumento do índice hepático, indução significativa do etoxiresorufin-O-detilase (EROD), além do aumento da concentração de aductos hepáticos (KRUIZZYNSKI; WILSON; ADDISON, 2001).

Estudos com efluentes da indústria de polpa tipo Kraft (BKME) branqueadas e não branqueadas demonstraram a ocorrência de disfunção hepática em peixes expostos a este efluente (OIKARI; NAKARI, 1982). Em concentrações de  $8 \pm 20\%$  v/v, o efluente com branqueamento causou a mortalidade de pré-larvas após exposição de 72 horas (BURTON *et al.*, 1983).

Adms (1995) constatou que peixes do Rio Pigeon, Carolina do Norte, U.S., apresentaram alteração dos níveis hormonais, na reprodução, no sistema metabólico, desequilíbrio metabólico, nutricional, danos no DNA e lesões cancerosas além de alterações na dinâmica da comunidade.

Atribuiu estes efeitos aos poluentes da indústria de papel.

Contudo, apesar dos polifenóis clorados, presentes nos efluentes, serem os contaminantes ambientais mais investigados devido à preocupação com a sua persistência e toxicidade (SIBLEY *et al.*, 1997), eles não constituem os únicos agentes de poluição ambiental. Outros mecanismos também são impactantes, conforme Owens (1990), Easton *et al* (1997), Smits *et al.* (1995) e Lehitnen *et al.* (1999): eutrofização do sedimento, por fibra, lignina e ácidos orgânicos; efeitos mutagênicos e estrogênicos das resinas ácidas; aumento da turbidez por corantes, turbidez pela lignina, caulim e pigmentos; mecanismos de bioacumulação e de biomagnificação; aceleração da sedimentação de fibras e material inorgânico.

## **2.7 Legislação aplicada à avaliação da qualidade de águas naturais e efluentes**

Há uma convergência quanto aos parâmetros que norteiam a Legislação Federal e Estadual do Brasil, sobre os recursos hídricos. Os principais enfoques são: definição e classificação, outorga e concessão, exploração e participação dos recursos obtidos, gerenciamento e critérios de direito de uso, penalidades, incentivos, criação de agências e conselhos, em detrimento da consideração da implantação de metodologias que melhorem o controle de qualidade das águas.

Das legislações sobre a proteção e melhoria da qualidade ambiental, destacam-se a Resolução Federal do CONAMA nº 20/86 e do Estado de Santa Catarina, a Lei Estadual nº 5.937 de 15 de junho de 1980 e o Decreto Estadual nº 14.250 que estabelecem os limites físico-químicos e bacteriológicos da qualidade das águas.

Considerando-se que os efluentes respondem por uma parcela significativa dos danos ambientais e que a caracterização dos despejos industriais e domésticos tem como objetivos subsidiar projetos para a instalação de estações de tratamento, monitorar o desempenho de sistemas de tratamento físico-químico e biológico, além de atender às normas e leis vigentes, o Decreto Nº 14.250, dos Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos, no Art. 19, estabelece que “Os efluentes líquidos, além de obedecerem aos padrões

gerais anteriores, não deverão conferir ao corpo receptor características em desacordo com os critérios e padrões de qualidade de água, adequados aos diversos usos benéficos previstos para o corpo da água”.

Os despejos domésticos e industriais podem ser causadores de impacto ambiental negativo. A Resolução nº 001, art. 1º, do CONAMA, de 23/1/86, define o impacto ambiental como “qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam: a saúde; a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; e/ou a qualidade dos recursos ambientais”.

Ressalta-se que as determinações legais padronizadas para controle ambiental assim como a legislação das águas, não contemplam análises dos efeitos biológicos. Todos os padrões de controle de qualidade estabelecidos são físico-químicos e bacteriológicos, e não contemplam os ensaios de toxicidade crônica, como ocorre em outros países. Podendo, os mesmos, serem apontados como insuficientes e inadequados, como evidenciam estudos anteriores sobre este particular (SOARES *et al.*, 1997; PEDROSA *et al.*, 1997; PEDROSA *et al.*, 2001; SOARES e DURÁN, 1998, SOARES e MOSIMANN, 2000, WILHELM FILHO *et al.*; 1997 e RIBEIRO *et al.*, 2000).

Para Ferolla (2003) o diagnóstico ambiental permite definir, de forma mais completa, a Política Ambiental das instituições. Nesta linha de ação, países têm realizado a revisão das tecnologias de produção mais poluentes com a finalidade de substituí-las por outras de menor impacto ambiental. Atualmente, alguns países, por exemplo, a Alemanha e a Áustria incluíram na sua legislação padrões toxicológicos para o lançamento do efluente da polpa química. Também o Reino Unido, em 1990 introduziu um controle integrado de poluição, para prevenir e proteger o meio de danos. Muitas indústrias de polpa e papel aderiram a estas alterações e a implantação destas tecnologias não apresentou custos excessivos (THOMPSON *et al.*, 2001).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Sítios de estudo



A região em estudo fica no município de Correia Pinto, SC, onde está instalada a principal fábrica de polpa de celulose tipo Kraft e que lança seu efluente no Rio Canoas. Este rio intercala espaços de leito pedregoso com outros de leito lodoso, o que torna difícil sua navegação. Sua área de drenagem é de 15.012km<sup>2</sup>. É um rio de grande porte que recebe inúmeros afluentes até compor a Bacia do Uruguai pela confluência com o Rio Pelotas, no município de Celso Ramos, SC.

### 3.1.1 Sítios A e B

Para a escolha dos dois sítios para colocação das gaiolas com os peixes, tomou-se como referência a localização da emissão do efluente no rio Canoas, ou seja, a jusante e a montante do ponto de despejo do efluente da indústria (Figura 06). A seleção dos locais foi realizada após várias saídas a campo por navegação no rio, o que permitiu reconhecer a região e os acessos aos locais de trabalho. Além desta, os resultados das determinações físico-químicas da água do rio nesta mesma região e período de estudo, obtidos por Paiva (2004), também serviram como referência, além da avaliação visual das condições da região (presença de espuma, fibras de celulose e odores).

As determinações realizadas por Paiva (2003), em amostras de água coletadas no mesmo trecho e período deste estudo, no Rio Canoas, foram: pH; temperatura; condutividade; oxigênio dissolvido; sulfeto; fósforo; fenol método da Amino-antipirina-AAP; fenol método Folin e demanda química de oxigênio (DQO).

O primeiro sítio selecionado, denominado A, situou-se 10Km a montante do local do despejo do efluente. O segundo, denominado B, a 5Km do ponto de lançamento do efluente. Ambos os locais estão dentro das coordenadas de longitude de 50°19 e de latitude 27° 30' (Figura 04).

Destaca-se que entre o local do despejo do efluente da indústria e o sítio B, existe uma ponte na Br 116, sobre o Rio Canoas, a qual serviu de referência do limite da propriedade da indústria (Figuras 03 e 05).





Figura 03: Fotografia aérea parcial do município de Correia Pinto, SC. Foram indicados o sítio B, ponte sobre a Br 116 e a indústria de polpa e papel de celulose (KLABIN). Fonte: EPAGRI, 1978.

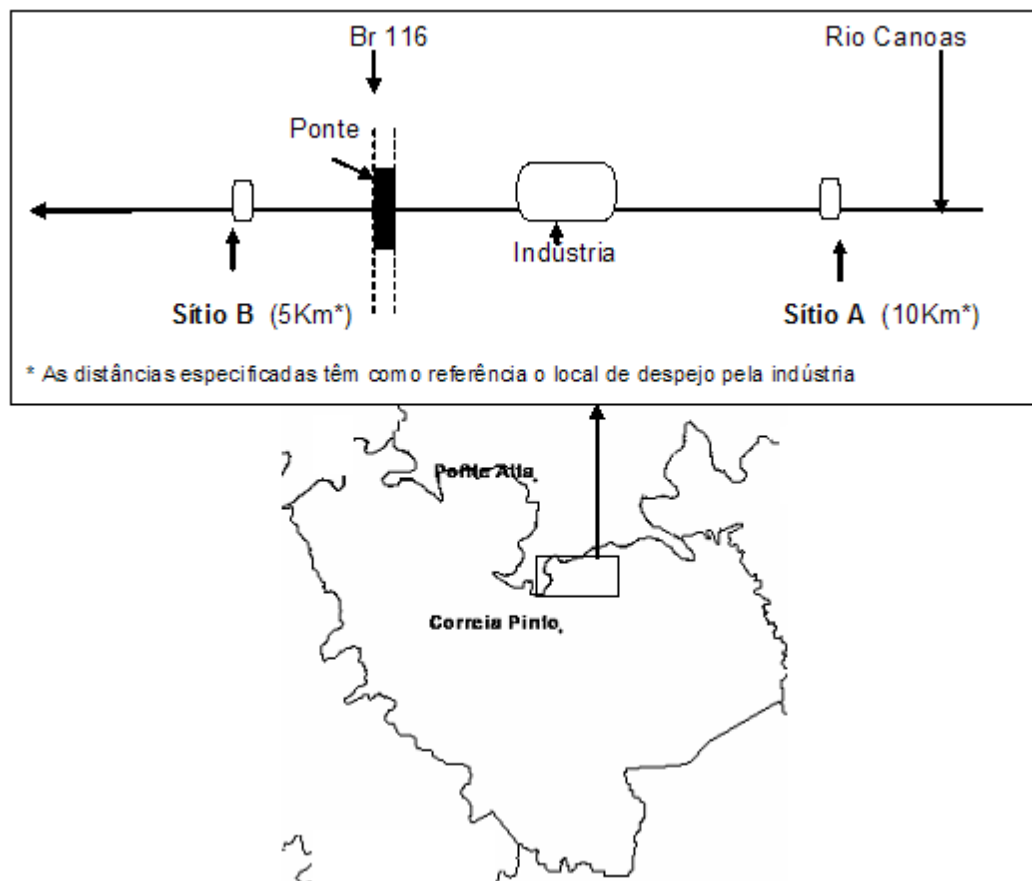


Figura 04: Mapa do município de Correia Pinto, ressaltada a região do estudo.



Figura 05: Ponte da Br 116 sobre o Rio Canoas e o sítio B, no município de Correia Pinto.

### 3.1.2 Sítio controle

Para fins de comparação visando determinar a magnitude de alterações bioquímicas e fisiológicas nos peixes expostos aos poluentes no Rio Canoas foi necessário estabelecer valores de referência obtidos em local não contaminado por qualquer tipo de poluentes. Neste sentido, foi selecionado o Ribeirão Cotia afluente do Rio Canoas, localizado no município de Lages, SC, próximo à região em estudo, na tentativa de manter, entre esse local e os da exposição no Rio Canoas, as mesmas condições de temperatura, altitude e vegetação. Essa escolha baseou-se em informações do IBAMA e nos resultados das análises físico-químicas e de toxicidade aguda das amostras de água do referido rio, realizadas no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica.

Este rio está livre do despejo de efluentes industriais ou domésticos e qualquer outro tipo de dejetos. Na região, até o local citado não se observou a presença de plantações agrícolas. E, portanto, será sempre mencionado neste texto como local controle.

### 3.2 Efluente da indústria de papel e celulose

O tipo de efluente lançado na área de estudo é o efluente da fabricação de polpa de celulose tipo Kraft, com branqueamento convencional OCEDE (O= tratamento com O<sub>2</sub>, C= tratamento com Cl<sub>2</sub>, E= extração alcalina com NaOH, D= tratamento ClO<sub>2</sub>).

As madeiras utilizadas no processo são oriundas do *Pinus* e *Eucalyptus*.

O sistema de tratamento dos efluentes da indústria inicia com o recebimento do despejo industrial no decantador primário. Este despejo contém resíduo de pasta celulósica perdida no processo, a qual decanta juntamente com outras matérias sedimentáveis. A torta formada pela matéria decantada é prensada e serve para compostagem e para beneficiamento em outras unidades. A porção líquida que sai do decantador por transbordo recebe uma dosagem de uréia e ácido fosfórico, cuja função é servir de nutrientes para as bactérias. Este resíduo líquido segue para a primeira lagoa, de aeração, onde recebe uma injeção de oxigênio molecular, para acelerar a velocidade de degradação dos seus componentes químicos. Na sequência, o efluente segue para a lagoa de estabilização. O efluente resultante deste processo é despejado no Rio Canoas, numa vazão aproximada de 800m<sup>3</sup>/h (Figura 06).





**Figura 06:** Tubulação de despejo do efluente da indústria de polpa de celulose, no Rio Canoas.

### **3.3 Bioindicador**

O bioindicador de escolha foi a espécie de peixe *Oreochromis niloticus* (tilápia), a qual tem sido intensivamente estudada no laboratório de ecotoxicologia aquática da UFSC.

### **3.4 Metodologia de exposição**

Os peixes utilizados no experimento foram mantidos no Laboratório de Avaliações Ecotoxicológicas na UFSC, por seis meses. Depois foram transportados para o local e aclimatados por um período de quinze dias, antes do início das coletas das amostras.

Os peixes foram mantidos nos locais pré-estabelecidos, em sistema de gaiolas. As gaiolas foram construídas no formato retangular com as seguintes dimensões: 1 m de altura, 1 m de largura e 1,5 m de comprimento. O volume final de cada gaiola foi de 1,5 m<sup>3</sup>. Tubos de PVC, de 50mm, foram utilizado para a estrutura básica. Depois de montada, a estrutura de tubos foi recoberta com tela plástica. A tela foi fixada com costura manual, utilizando linha de nylon. Os tubos, com exceção daqueles que ficaram na porção superior, foram perfurados, para permitir a entrada de água e assim submergir as gaiolas. Apenas a parte superior dos canos não perfurados ficou emersa permitindo a flutuação das gaiolas. Na parte superior das mesmas a rede foi mantida parcialmente móvel para que se ter acesso ao seu interior nos momentos

de colocação e coleta dos peixes. A rede na parte superior teve como finalidade impedir a saída dos peixes e /ou o ataque a estes por outros animais, além de manter a ração que era colocada diariamente (Figura 07).



**Figura 07: Imagem da gaiola utilizada no experimento.**

Nas gaiolas, a densidade média de estocagem (número de indivíduos estocados por unidade de volume) foi de 16 peixes por  $m^3$ . Cada gaiola foi povoada com 24 (vinte e quatro) peixes.

Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial extrusada, balanceada e específica para peixes. Essa ração possui grande capacidade de flutuação.

#### **3.4.1 Exposição do grupo de peixes referência de laboratório**

Os peixes (24 indivíduos) utilizados como referência de laboratório permaneceram em aquários oxigenados, pelo mesmo período da exposição em campo, ou seja, sessenta dias, embora, não no mesmo espaço temporal, isto é, em experimentos anteriores. Também, foram alimentados com a mesma ração que os peixes do experimento de campo.

#### **3.4.2 Exposição do grupo de peixes controle de campo**

Os peixes no local controle foram mantidos em gaiola conforme a metodologia para o experimento no Rio Canoas. Contudo, ao invés de a gaiola ter sido colocada diretamente no rio, ela foi instalada em uma das calhas do sistema de cultivo de peixes da Estação de Piscicultura do IBAMA, que é abastecida diretamente com a água corrente do Ribeirão Cotia.

### 3.5 Coleta e conservação das amostras

A coleta das amostras de sangue e tecidos dos peixes (*O. niloticus*) foi quinzenal, a partir da data da colocação das gaiolas, em 11/01/2003 (sítio B), e 25/01/2003 (sítio A). As datas de coleta, no sítio B, foram: 25/01/2003, 09/02/2003, 23/02/2003, 09/03/2003 e no sítio A, a coleta se deu em 09/02/2003.

A gaiola com o grupo de peixes controle foi colocada em 21/03/2004. As datas das coletas das amostras do controle foram: 05/04/2004, 19/04/2004 e 03/05/2004.

Em cada coleta o procedimento foi o seguinte:

1. Os peixes, em número de seis, foram retirados individualmente da gaiola, com o uso do pulsar.
2. Imediatamente após a retirada de cada peixe, no próprio local, procedeu-se a coleta da amostra de sangue utilizando-se seringa heparinizada (0,1 ml) para a punção na veia caudal. Com sangue da ponta da seringa foi preparado o esfregaço sangüíneo em lâminas de vidro, em duplicata, para posterior coloração.
3. As amostras de sangue foram coletadas e dispostas em *ependorf* previamente identificado com o número do peixe. Parte deste sangue foi utilizada para posterior determinação do micro-hematócrito pela retirada com microcapilar de vidro heparinizado, o qual foi vedado com massa selante e disposto em tubo de ensaio identificado com o número do peixe. Imediatamente após, com micro-pipeta coletou-se 10µl de sangue que foi acondicionado em outro *ependorf*, também devidamente identificado, para posterior

análise de hemoglobina. As amostras de sangue foram mantidas resfriadas em caixas de isopor com gelo reciclável.

4. Os peixes foram embalados em sacos de polietileno previamente identificados com o número do animal e mantidos resfriados em caixas de isopor com gelo reciclável.

5. Após o término destes procedimentos cada peixe foi aberto por incisão abdominal longitudinal (da cloaca até o opérculo), com o auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas inoxidáveis. Retirou-se o fígado e as brânquias, que foram acondicionados em frascos de vidro com solução de formalina a 10%, tamponada, para posterior exame histológico.

6. O fígado foi retirado e seccionado em duas partes. Uma primeira, acondicionada em frascos de vidro com solução de formalina, a 10%, tamponada; uma segunda parte foi congelada em nitrogênio líquido e destinada às análises de enzimas hepáticas e antioxidantes (Laboratório de Ecofisiologia Respiratória da UFSC).

7. No local do laboratório de campo, improvisado dentro da propriedade rural situada no ponto B (Figura 08), as amostras de sangue foram centrifugadas (10.000 rpm - 5 minutos). As amostras de plasma foram separadas com micro-pipetas de 100 µl e acondicionadas em *eppendorf*, devidamente identificados e mantidos congelados até à análise.

8. Cada peixe foi pesado eviscerado. Seu comprimento total (medida das extremidades do início da cabeça até o final da nadadeira caudal) foi determinado em centímetros, com ictiômetro (régua milimetrada colocada sobre uma superfície plana).

### **3.5.1 Amostragem dos peixes do grupo referência de laboratório**

Foram realizadas quatro (4) coletas de amostras de sangue, em intervalos quinzenais. Seis (6) peixes foram sacrificados em cada uma das coletas realizadas, seguindo os mesmos procedimentos de campo para coleta de sangue. A metodologia analítica empregada para avaliar os parâmetros bioquímicos do grupo de peixes referência de laboratório foi mesma empregada nos estudos de campo e estão descritas a seguir.

Salienta-se que os resultados utilizados neste estudo foram obtidos a partir da média dos resultados das quatro coletas, já que estes não apresentaram variações significativas entre si, conforme Soares, 2004.

## **3.6 Análise de parâmetros biológicos**

### **3.6.1. Índice geral**

O índice geral (IG) foi calculado dividindo-se o peso médio em gramas pelo tamanho médio em centímetros, dos peixes ( $IG = \text{peso médio por tamanho médio}$ ).

### **3.6.2 Análise citológica do sangue**

Os esfregaços de sangue foram feitos em lâminas histológicas devidamente limpas e desengorduradas, seguindo as recomendações e procedimentos de Pérez e Ranzani-Paiva (1991). Foram elaboradas quatro lâminas para cada peixe, duas coradas pelo corante hematológico May-Grunwald e duas pelo corante Leishman.



Estas colorações permitem a diferenciação celular e o conseqüente reconhecimento das células.

No corante May-Grunwald, a forma ativa do azul de metileno, corante básico, confere coloração azul-violácea aos componentes ácidos da célula. Ao contrário, a eosina, também presente neste, é um componente ácido que confere coloração rosada, aos componentes básicos da célula, encontrados principalmente nas proteínas ricas em aminoácidos básicos.

A hematoxilina, do corante Leishman, reage com os ácidos nucléicos, conferindo ao núcleo uma coloração azulada.

### **3.6.3 Análise histológica**

Os tecidos coletados, fígado e brânquias, foram processados conforme a seguinte sequência:

1. inclusão do tecido em parafina pelas técnicas convencionais em histologia;
2. cortes com espessura de 5µm com micrótomo;
3. preparação das lâminas;
4. coloração das lâminas com os corantes hematoxilina e eosina;

As lâminas prontas foram analisadas em microscópio e fotografadas.

### **3.6.4 Parâmetros hematológicos**

Foram analisados os parâmetros concentração de hemoglobina e taxa do hematócrito.

#### **3.6.4.1 Hemoglobina**

A análise de hemoglobina seguiu a metodologia do cianeto de metahemoglobina. Neste método o grupamento heme da hemoglobina é oxidado pelo ferrocianeto, formando hemihemoglobina. A hemihemoglobina reage com o cianeto ionizado e produz o cianeto de hemihemoglobina, cuja concentração é proporcional à concentração de hemoglobina e determinada em 540nm.

### 3.6.4.2 Hematócrito

Os valores do micro-hematócrito foram determinados após a centrifugação (5.000 rpm / 5 minutos) dos microcapilares da amostra de sangue coletado anteriormente. Os valores foram determinados por leitura direta em régua para hematócrito.

### 3.6.5 Enzimas plasmáticas

As dosagens bioquímicas de enzimas plasmáticas foram realizadas utilizando-se técnicas convencionais em análises clínicas, utilizando método automatizado (SOARES, BAPTISTA e MOISMAN, 2000).

No laboratório de análises clínicas as amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e as determinações das enzimas plasmáticas fosfatase alcalina (FA), alanina transferase (ALT), aspartato transferase (AST), gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) e colinesterase (Che) foram realizadas por método espectrofotométrico automatizado.

Os fundamentos de cada método serão explanados a seguir.

#### 3.6.5.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A dosagem da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) foi realizada pelo método embasado na reação de transaminação entre o L-aspartato e o  $\alpha$ -cetoglutarato, com produção de oxaloacetato e hidrazona-derivado. Leitura em absorbância de 505nm.

#### 3.6.5.2 Alanina aminotransferase (ALT)

A dosagem da atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) seguiu o método fundamentado na reação de transaminação entre o L-alanina e o  $\alpha$ -cetoglutarato, com geração de piruvato, o qual é proporcional à concentração de TGP. Leitura em absorbância de 505nm.

### **3.6.5.3 Fosfatase alcalina (FA)**

A análise da fosfatase alcalina segue o método cinético enzimático, no qual o p-nitrofenilfosfato de sódio é hidrolisado pela fosfatase alcalina do plasma pH 9,8 liberando o p-nitrofenol, cuja velocidade de formação é medida em 405nm, sendo esta proporcional à atividade da enzima presente.

### **3.6.5.4 Gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT)**

A determinação da atividade enzimática da gama-glutamil transferase fundamenta-se no método em que esta enzima ( $\gamma$ -GT) catalisa a reação de transferência do grupamento glutamil da L-g-glutamil-3-carboxy-4-nitroanilida para a glicilglicina originando L-g-glutamilglicil-glicina e 5-amino-2-nitro-benzoato, cuja concentração é proporcional à concentração da enzima gama-glutamil transferase. A leitura, em espectrofotômetro, é realizada a 405nm.

### **3.6.5.5 Colinesterase (Che)**

A determinação da colinesterase (Che) ou pseudocolinesterase do plasma se fundamenta na transformação da butirilcolina em meio aquoso pela colinesterase em tiocolina e butirato. O butirato reage com o ácido 5,5'-diisobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e produz o composto 2-nitro-5-mercaptopbenzoato, cuja concentração é proporcional à concentração de acetilcolinesterase. Leitura em absorbância de 405nm.

### **3.6.6 Análise de metabólitos**

A partir das amostras de plasma congelado foram pesquisados os seguintes metabólitos: a glicose,

o colesterol total, o HDL-C e o LDL-C. No laboratório de análises clínicas, as amostras de plasma foram descongeladas em temperatura ambiente e as determinações foram realizadas com método automatizado.

#### **3.6.6.1 Glicose**

Neste método enzimático a glicose é transformada, pela ação da glicose oxidase, em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio mais o reativo 4-aminoantipirina e o fenol sob a ação da peroxidase geram o composto quinonimina cuja concentração é proporcional à concentração de glicose e é medido em absorbância de 500nm.

#### **3.6.6.2 Triacilgliceróis**

Os triacilgliceróis séricos foram determinados pelo método enzimático glicerol, no qual os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase, originando glicerol e ácidos graxos. O glicerol produzido é fosforilado pelo glicerol quinase em glicerol 3-fosfato, que é oxidado liberando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminotripiplina e ESPAS originando um composto quinônico, cuja concentração é medida em absorbância de 505nm, e cuja quantidade é proporcional à concentração de triacilgliceróis.

#### **3.6.6.3 Colesterol total**

A dosagem do colesterol sérico total seguiu o método onde os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase produzindo o colesterol livre. A enzima colesterol oxidase, em presença de oxigênio, catalisa a oxidação do colesterol livre produzindo o peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente fenólico (fenol) pelo peróxido de hidrogênio formado em presença de 4-aminofenazona produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina), que apresenta um máximo de absorção em 500nm.

#### **3.6.6.4 Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade (HDL-C)**

A determinação do colesterol HDL foi realizada pelo método reativo precipitante, no qual a mistura de ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomícrons, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as de muito baixa densidade (VLDL), sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL e cujo conteúdo, em colesterol HDL, é determinado enzimaticamente.

#### **3.6.6.5 Colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C)**

A concentração de LDL-C foi calculada pela diferença entre o valor do colesterol total e o HDL-C. (LDL-C = colesterol total - HDL-C).

### **3.7 Determinações físico-químicas**

#### **3.7.1 Temperatura da água**

A temperatura da água em °C foi determinada, com termômetro de mercúrio, nos locais onde estavam colocadas as gaiolas.

#### **3.7.2 Condutividade da água**

A condutividade da água em  $\mu\text{S}/\text{cm}$  foi determinada com condutímetro, da marca Instruterm, nos locais onde estavam colocadas as gaiolas.

### **3.8 Análise estatística**

Os resultados dos parâmetros hematológicos, enzimáticos e metabólitos receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA que admite o nível de variância mínimo  $p < 0,05$  e complementado pelo pós teste Tukey-Kramer de múltipla comparação Test utilizando o software GraphPad InStat tm copyright (c) 1999-1994, GraphPad InStat software V2.05a, 951560S.

Os gráficos foram construídos utilizando-se o software Origin 5.0, copyright Microcal software 1991-1997, Inc..

## 4. RESULTADOS

Neste estudo, a avaliação visual das condições da região foi realizada por meio de várias saídas a campo, pelo rio e por terra. Especialmente com referência ao uso e ocupação do solo, nas margens do rio, no trecho estudado, não foi visualizado outro tipo de plantação além do *Pinus*, que se estende até à ponte localizada 3Km antes do sítio B, dentro da propriedade da Klabin. A mata ciliar encontra-se razoavelmente preservada, embora em alguns pontos limite-se a uma faixa bastante estreita, em torno de dois metros.

O levantamento permitiu também o reconhecimento e a escolha dos locais de colocação das gaiolas, conforme descrição na seção “Metodologia”.

As gaiolas com os peixes, colocadas na margem do rio, permaneceram estáveis nos locais onde foram deixadas sendo que sua fixação com cordas de nylon, amarradas a árvores da margem do rio, mostrou-se adequada. Não se observou movimento que causasse danos na estrutura ou tela. Sua superfície reteve com sucesso a ração que era colocada diariamente. Não houve a entrada de outros peixes ou de animais.

A manutenção dos peixes nas gaiolas transcorreu, portanto, sem problemas, não tendo sido observada mortalidade. Os peixes consumiram a ração e esta foi encontrada no estômago dos mesmos. O índice de desenvolvimento geral também aponta para uma alimentação adequada (Tabela 02). No sítio B foram realizadas quatro coletas quinzenais, nas datas e condições de temperatura e condutividade apresentadas na tabela 01.

Contudo, o mesmo quadro não foi observado no sítio A, localizado a montante do lançamento do efluente. Neste sítio foi realizada uma única coleta, depois da exposição de quinze dias, pois os peixes desapareceram após este período. A hipótese para tentar explicar o desaparecimento é a de que o responsável pelos cuidados com as gaiolas (voluntário da comunidade) não cumpriu com o estabelecido, tendo sido a gaiola encontrada fechada, sem sinal de dano, porém abandonada.

Em cada coleta, os peixes (n= 6) foram retirados individualmente da gaiola e manipulados no próprio local para a retirada das amostras de sangue e órgãos. As amostras foram devidamente identificadas e conservadas até a sua análise.

#### 4.1 Dados físico-químicos da água no momento das coletas

Durante o experimento realizado, no período total de sessenta dias (final do mês de janeiro e início do mês de março de 2003), a temperatura média da água do Rio Canoas foi de 21,8°C e a condutividade de 0,064  $\mu\text{S}/\text{cm}$  em média (Tabela 01).

**Tabela 01. Datas das coletas e condições de temperatura e condutividade nos sítios A e B.**

	Temperatura °C	Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$
<b>Coleta no sítio A</b>		
Primeira coleta .09/02/2003	22	0,072
<b>Coletas no sítio B</b>		
Primeira coleta 25/01/2003	19	0,074
Segunda coleta 09/02/2003	22	0,083
Terceira coleta 23/02/2003	22	0,052
Quarta coleta 09/03/2003	24	0,051

## 4.2 Parâmetros biométricos dos peixes

Os resultados dos parâmetros, tamanho, peso e índice geral, determinados nos peixes controle e nos dos sítios em estudo - A e B - são apresentados na tabela 02. Observou-se que o grupo de peixes controle apresentou, em todos os parâmetros, valores superiores aos dos dois sítios estudados. A análise comparativa entre os peixes dos sítios A e B, no período de exposição de quinze dias, demonstrou resultados semelhantes em ambos os sítios, em todos os parâmetros biométricos.

Deve-se ressaltar que os peixes utilizados no experimento não foram selecionados pelo peso ou tamanho, embora tenha sido tomado o cuidado de não se utilizar peixes em condições muito variadas, com relação a estes parâmetros. A coleta destes, para amostragem, foi aleatória.

**Tabela 02: Sumário comparativo entre os valores dos parâmetros morfométricos avaliados nos peixes (*O. niloticus*) do local controle e dos sítios estudados.**

Local	Controle			Sítio A		Sítio B		
Período (dia)	15	30	45	15	15	30	45	60
Peso (g)	99,7	133,9	118,6	67,6	78,9	93,1	85,9	66,0
Tamanho (cm)	18,5	20,3	19,1	15,8	17,8	18,7	17,1	15,8
Índice geral (g/cm)	5,4	6,6	6,2	4,3	4,2	5,0	5,0	4,2

## 4.3 Parâmetros biológicos

Foram avaliados parâmetros citológicos do sangue, histológicos (fígado e brânquias), hematológicos (hematócrito e hemoglobina), enzimáticos (fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST),  $\gamma$ -glutamyl transferase e colinesterase (Che) e



metabólitos plasmáticos (glicose, triacilgliceróis, colesterol total, LDL-C e HDL-C).

#### 4.3.1 Análise citológica do sangue

A avaliação citológica do sangue permitiu evidenciar a estrutura morfológica das células. Observou-se que as células sangüíneas apresentaram maior tendência à divisão, além de alterações da membrana nuclear, a qual apresentou aspecto rugoso com pequenas formações tipo invaginações. Os núcleos apresentaram-se com granulações modificadas e com perda do formato oval, deslocamento do ponto central da célula em direção à membrana citoplasmática, sendo que também a proporção do volume do núcleo em relação ao citoplasma estava alterada. Além destas alterações, foi constatada a presença de um número maior de eritrócitos imaturos, caracterizados por sua forma arredondada (Figura 09) quando comparados aos do controle (Figura 10). As alterações citológicas observadas foram semelhantes nos dois locais, sítio A e sítio B.



**Figura 09:** Seção de lâminas de sangue da primeira e segunda coleta, do grupo de peixes (*O. niloticus*) do sítio B, com resolução de 1000 vezes por imersão.

**Figura 10:** Seção de lâminas de sangue, do grupo de peixes (*O. niloticus*) controle de laboratório (quinze dias

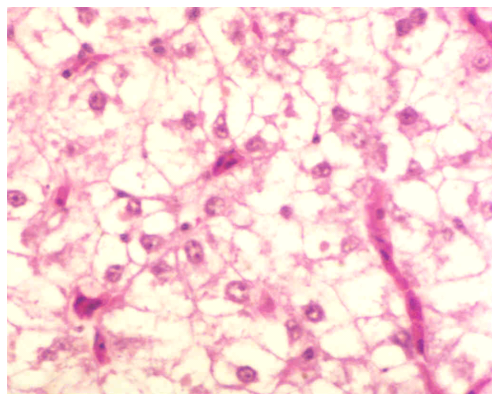
de exposição), com resolução de 1000 vezes por imersão.

### 4.3.2 Análise histológica

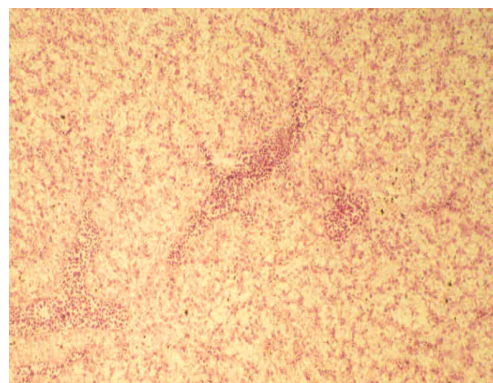
Destaca-se que, apesar da importância, o índice hepatossomático (relação entre o peso do fígado e o peso total do peixe) não foi determinado. Justifica-se tal procedimento pelo fato de que o fígado, no momento da coleta, precisou ser seccionado em duas partes, sendo a primeira destinada à histologia, parte deste estudo, e a segunda, congelada em nitrogênio líquido e encaminhada para o Laboratório de Ecofisiologia Respiratória da UFSC, sob a coordenação do professor Danilo Wilhlem Filho, para estudo de estresse oxidativo. Estes resultados não foram relatados neste texto como tal, mas são abordados na discussão. A necessidade do congelamento imediato deve-se ao fato de que a autólise dos tecidos de peixes é muito elevada quando comparada com a dos animais homeotermos, o que exige uma rápida manipulação, para evitar degenerações, fato que impediu a manutenção do fígado para posterior pesagem. Contudo foi realizada uma análise visual, com o objetivo de se identificar o estado geral do órgão. O aspecto morfológico dos fígados na primeira coleta (quinze dias de exposição), no local a jusante do lançamento do efluente, sítio B, apresentou aumento significativo do volume além da fragilidade ao manuseio, com tendência à fragmentação, estado observado também na segunda coleta (trinta dias). Aqui deve ser destacado que este resultado foi observado na semana após a “parada” da empresa, na qual se realizou a limpeza da lagoa de tratamento primário. Esta limpeza promove o lançamento de maior quantidade de poluentes no rio e, portanto, potencializa uma alteração da condição ambiental. Nas duas últimas coletas (quarenta e cinco e sessenta dias), o aspecto era de fígados mais firmes e com tamanho aparentemente normal, o que pode indicar uma adaptação dos peixes ao meio.

No local a montante do lançamento do efluente, sítio A, os fígados, após quinze dias de exposição, apresentaram aspecto morfológico normal, isto é, com textura, tamanho e cor aparentemente dentro dos padrões observados para o grupo de peixes do controle. Contudo, os dados da análise histológica dos fígados dos peixes dos sítios A e B apontaram para alterações teciduais, com a presença de vacúolos resultantes da infiltração de lipídios e deslocamento do núcleo dos hepatócitos para a membrana citoplasmática. O tecido hepático denotou características de hipertrofia em ambos os sítios A e B (Figura

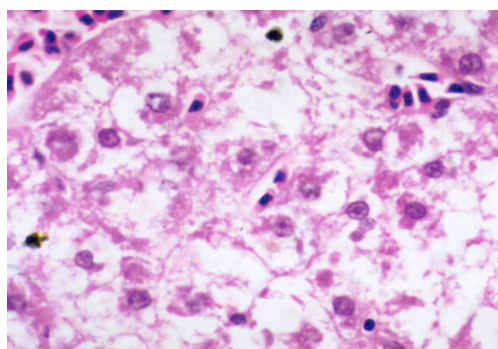
11). Na figura 12 são apresentados cortes histológicos do fígado de peixes do grupo controle.



**Sítio A, 15 dias exposição, resolução de 400vezes.**

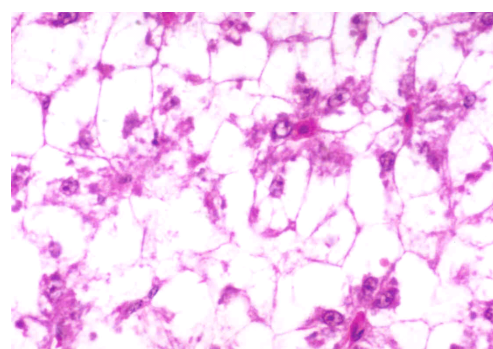


**Sítio B, 15 dias de exposição, fígado necrosado, resolução 200vezes.**



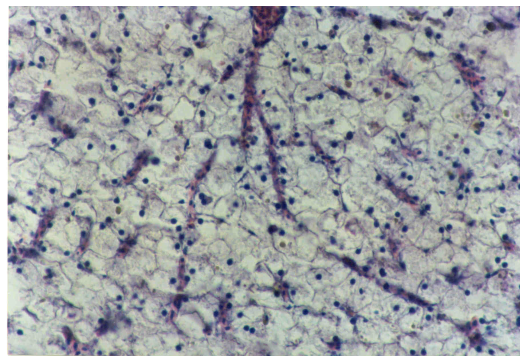
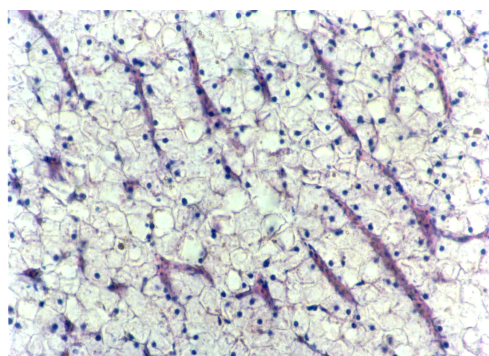
**resolução 400vezes.**

**Sítio B 30 dias de exposição, resolução**



**Sítio B 45 dias de exposição, resolução 400vezes.**

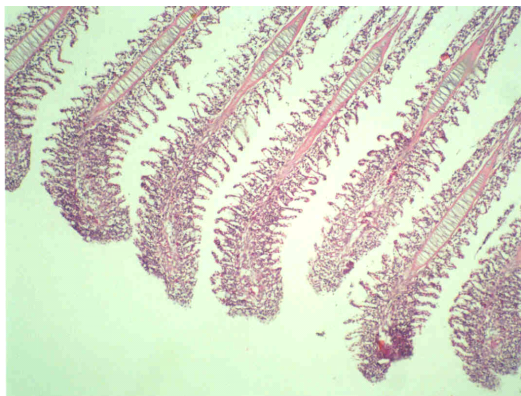
**Figura 11. Cortes histológicos do fígado de peixes (*O. niloticus*), dos sítios A e B.**



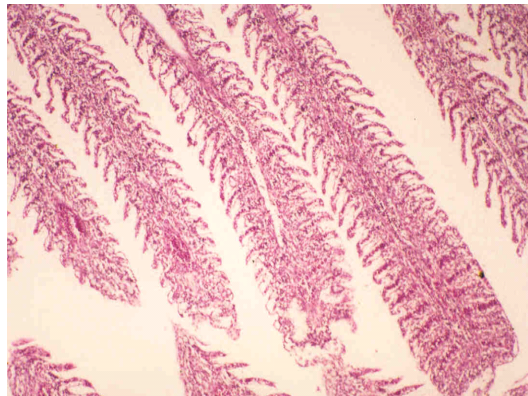
**Figura 12. Corte histológico do fígado de peixes (*O. niloticus*) do grupo controle de laboratório (15 dias de exposição), com resolução de 200 vezes.**

As brânquias exibiram hipertrofia do tecido epitelial das lamelas secundárias, com fusão lamelar que compromete o sistema vascular pela obstrução dos capilares (Figura 13). Estes resultados foram observados nos sítios A e B, com variação apenas de intensidade, sendo que no sítio B os efeitos foram mais pronunciados. A figura 14 ilustra lamelas do grupo de peixes controle.



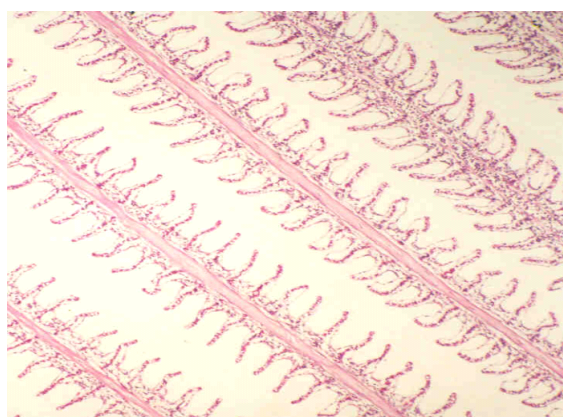


Sítio A



Sítio B

**Figura 13. Cortes histológicos demonstrando as lamelas secundárias dos peixes dos sítios A e B, após quinze dias de exposição (primeira coleta), com resolução de 400 vezes.**



**Figura 14. Corte histológico de lamelas secundárias do grupo de peixes controle de laboratório (quinze dias de exposição), com resolução de 400 vezes.**

### 4.3.3 Parâmetros hematológicos

#### 4.3.3.1 Hemoglobina

No sítio B o valor da concentração de hemoglobina, após atingir o maior valor, na exposição de trinta dias ( $8,3 \text{ mg/dL} \pm 0,2 \text{ EPM}$ ), apresentou tendência constante à redução. Atingiu o menor valor ao final da exposição de sessenta dias ( $6,4 \text{ mg/dL} \pm 0,2 \text{ EPM}$ ), resultado este significativamente inferior ao da referência de laboratório ( $7,4 \text{ mg/dL}$ ). O valor da primeira coleta foi de  $8,1 \text{ mg/dL} \pm 0,09 \text{ EPM}$  e da terceira foi de  $7,4 \text{ mg/dL} \pm 0,3 \text{ EPM}$  (Figura 15). A ausência dos resultados do sítio A e do controle, referentes à terceira coleta, deveu-se a problemas analíticos que inviabilizaram as análises.

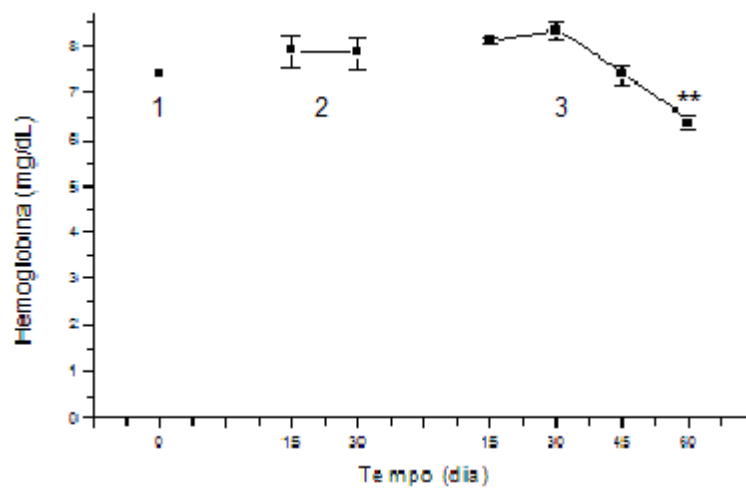


Figura 15. Variação da concentração de hemoglobina do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15 e 30 dias), 3= sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

\*\* = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para a significância de  $p < 0,01$ .

#### 4.3.3.2 Hematócrito

No sítio B observamos uma elevação inicial da taxa do hematócrito, a qual atingiu o valor máximo de  $34,4\% \pm 1,3$  EPM na segunda coleta para, em seguida, reduzir-se. O valor da taxa do hematócrito na última coleta foi de  $28,6\% \pm 1,3$  EPM. Neste sítio os resultados de todas as coletas, com exceção da primeira, foram significativamente superiores ao da referência de laboratório ( $23,0\%$ ). Apenas os resultados da segunda e terceira coleta superaram de forma significativa os do controle de campo ( $22,8 \text{ mg/dL} \pm 0,9$  EPM). A taxa do hematócrito, no sítio A, foi de  $29\% \pm 0,9$  EPM, em quinze dias de exposição, significativamente superior à da referência de laboratório e à taxa do controle de campo (Figura 16).

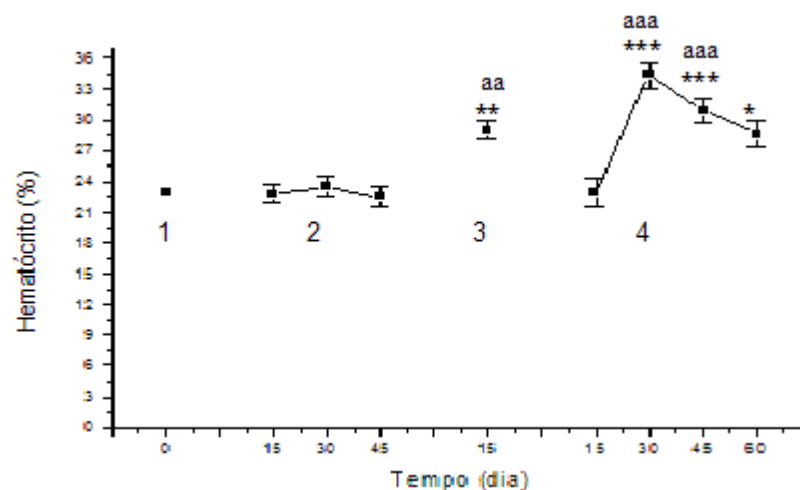


Figura 16. Variação da taxa do hematócrito do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0

dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3= sítio A (15 dias), 4 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*), (\*\*), (\*\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,05$ ; 0,01 e 0,001, respectivamente.

(aa), (aaa) = valor significativamente diferente ao do controle de campo considerando as significâncias de  $p < 0,01$  e 0,001, respectivamente.

#### 4.3.4 Enzimas plasmáticas

##### 4.3.4.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A atividade enzimática da AST, no sítio B, demonstrou uma redução da primeira (85,4 UI/dL  $\pm$ 12,9 EPM) coleta, quando comparada com os valores da segunda (43,19 UI/dL  $\pm$ 5,1 EPM), da terceira (38,7 UI/dL  $\pm$ 1,5 EPM) e da quarta (39,9 UI/dL  $\pm$ 1,8 EPM) coleta. Os valores da primeira e quarta coleta foram significativamente superiores ao da referência de laboratório. No sítio A, o valor da atividade enzimática da AST, após quinze dias de exposição, foi de 97,3 UI/dL  $\pm$ 7,0 EPM, significativamente superior ao da referência de laboratório (29,0 UI/dL) (Figura 17). A ausência dos resultados do controle de campo deveu-se a problemas analíticos que inviabilizaram as análises.

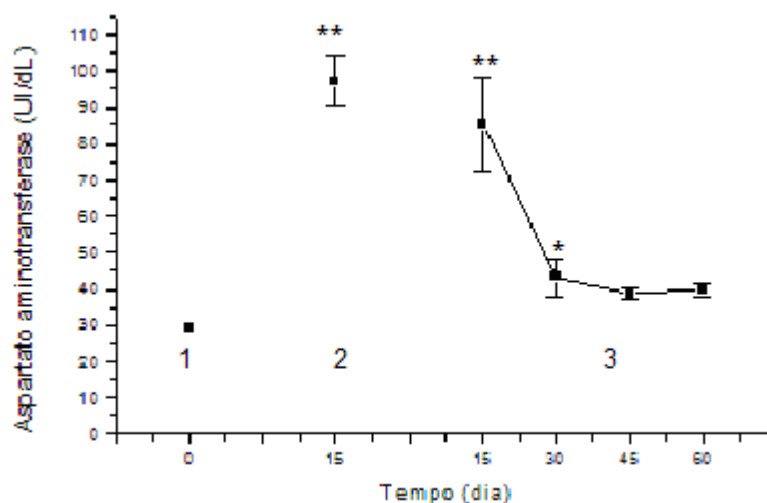


Figura 17. Variação da atividade da AST do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= sítio A (15 dias), 3 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*), (\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,05$  e 0,01,

respectivamente.

#### 4.3.4.2 Alanina aminotransferase (ALT)

No sítio B, observamos que a atividade enzimática da ALT, na primeira coleta, foi de 5,4 UI/dL  $\pm$ 0,9 EPM e na segunda foi de 13,2 UI/dL  $\pm$ 0,9 EPM. Os valores da terceira (11,9 UI/dL  $\pm$ 0,3 EPM) e quarta (11,8 UI/dL  $\pm$ 0,3 EPM) coletas superaram de forma significativa o valor da referência de laboratório (10,0 UI/dL). No sítio A, o valor da atividade enzimática da ALT foi de 12,8 UI/dL  $\pm$ 0,8 EPM, após quinze dias de exposição (Figura 18). A ausência do resultado do controle de campo referente à terceira coleta deveu-se a problemas analíticos que inviabilizaram as análises.

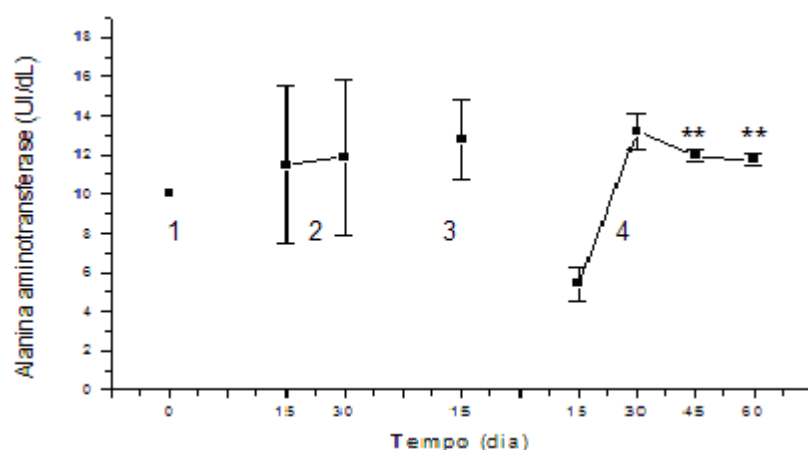


Figura 18. Variação da atividade da ALT do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15 e 30 dias), 3 = sítio A (15 dias), 4 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para a significância de  $p < 0,01$ .

#### 4.3.4.3 Fosfatase alcalina (FA)

No sítio B, o valor da atividade da FA da primeira coleta foi de 32,2 UI/dL  $\pm$ 3,8 EPM e da terceira, de 41,6 UI/dL  $\pm$ 4,5 EPM, resultados significativamente superiores ao da referência de laboratório (13,0 UI/dL). Na segunda e quarta coleta os valores foram de 39,9 UI/dL  $\pm$ 2,2 EPM e 36,0 UI/dL  $\pm$ 5,4 EPM,

respectivamente. No sítio A, após quinze dias de exposição, o valor da atividade enzimática da FA foi de 31,9 UI/dL  $\pm$  4,6 EPM, semelhante ao mesmo período no sítio B (32,2 UI/dL  $\pm$  3,8EPM), ambos significativamente diferentes do valor da referência de laboratório (13,0 UI/dL) (Figura 19).

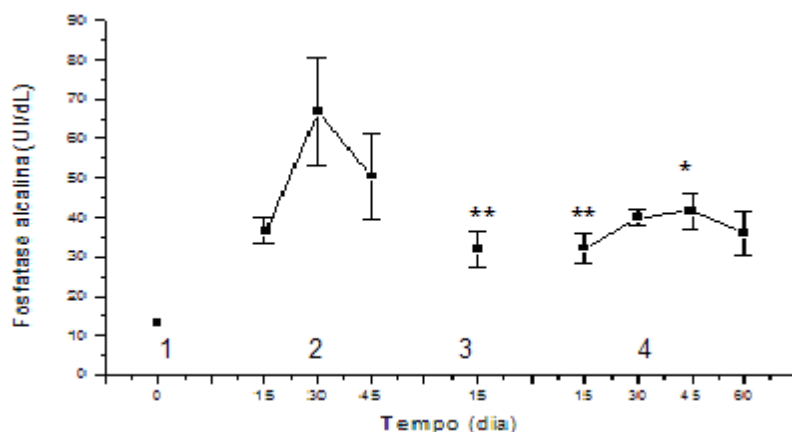


Figura 19. Variação da atividade da FA do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3 = sítio A (15 dias), 4 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*), (\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

#### 4.3.4.4 Gama glutamil tranferase ( $\gamma$ -GT)

No sítio B, a atividade enzimática da  $\gamma$ GT apresentou os seguintes valores: 2,3 UI/dL  $\pm$  0,5 EPM na primeira coleta; 1,4 UI/dL  $\pm$  0,4 EPM na segunda; 2,2 UI/dL  $\pm$  1,2 EPM na terceira e 3,0 UI/dL  $\pm$  2,1 EPM na quarta coleta (Figura 20).

O valor da atividade enzimática da gama glutamil transferase, no sítio A, foi de 4,7 UI/dL  $\pm$  0,5 EPM, significativamente superior ao resultado do sítio B (2,3 UI/dL  $\pm$  0,5 EPM), após quinze dias de exposição (Figura 20).



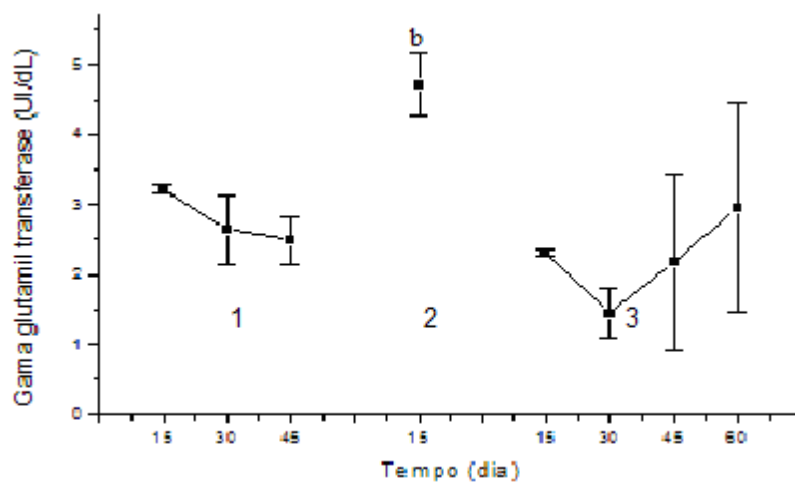


Figura 20. Variação da atividade da  $\gamma$ -GT do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 2 = sítio A (15 dias), 3 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(b) = valor significativamente diferente ao do sítio B na primeira quinzena para a significância de  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4.5 Colinesterase (Che)

A atividade da Che, no sítio B, não manteve um comportamento regular durante o todo o experimento. Na segunda coleta foi observado um aumento do valor da atividade enzimática, 1246,5 UI/dL  $\pm$  122,8 EPM, em relação ao da primeira, que foi de 996,0  $\pm$  119,0 EPM. Ao término da exposição (sessenta dias) a atividade enzimática foi de 1138, UI/dL  $\pm$  56,2 EPM, e a da terceira foi de 690,74  $\pm$  48,8 EPM. Os resultados de todas as coletas apresentaram valores significativamente superiores ao da referência de laboratório (309,9 UI/dL). Em relação ao controle de campo, somente os resultados da segunda, 1246,5  $\pm$  122,8 EPM, e da terceira, 690,74  $\pm$  48,8 EPM, coleta foram considerados significativamente diferentes nos períodos correspondentes (Figura 21).

No sítio A, após quinze dias de exposição, o valor da atividade enzimática da colinesterase, foi de 1318,1 UI/dL  $\pm$  43,4 EPM, valor significativamente superior ao resultado do sítio B (996,0  $\pm$  119,0 EPM) e ao do controle de campo (447,5  $\pm$  36,9 EPM), no mesmo período, bem como, ao da referência de laboratório (309,9 UI/dL) (Figura 21).

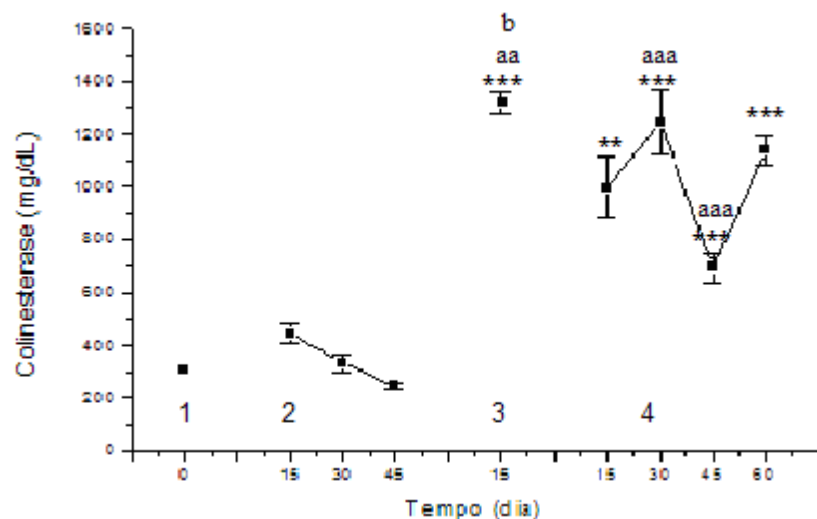


Figura 21. Variação da atividade da Che do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3 = sítio A (15 dias), 4 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*\*), (\*\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.

(aa), (aaa) = valor significativamente diferente ao do controle de campo para as significâncias de  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.

(b) = valor significativamente diferente ao do sítio B na primeira quinzena para a significância de  $p < 0,05$ .

### 4.3.5 Análise de metabólitos

#### 4.3.5.1 Glicose

No sítio B, a concentração da glicose não apresentou uma variação regular. Na primeira coleta foi de  $81,5 \text{ mg/dL} \pm 1,1 \text{ EPM}$ ; na segunda, foi de  $67,2 \pm 3,9 \text{ EPM}$ . Na terceira coleta atingiu o maior valor ( $123,2 \text{ mg/dL} \pm 11,0 \text{ EPM}$ ), resultado significativamente superior ao da referência de laboratório ( $38,0 \text{ mg/dL}$ ), bem como ao do controle de campo deste período ( $61,5 \text{ mg/dL} \pm 7,0 \text{ EPM}$ ). Ao final do experimento (sessenta dias) seu valor foi de  $55,9 \text{ mg/dL} \pm 2,8 \text{ EPM}$ . Em todas as coletas, com exceção da última, a concentração da glicose manteve-se significativamente superior à da referência de laboratório (Figura 22).

No sítio A, o valor da concentração de glicose foi de  $78,3 \text{ mg/dL} \pm 10,3 \text{ EPM}$ , e, no sítio B, foi de

81,5 mg/dL  $\pm$  1,18 EPM, após quinze dias de exposição. Estes valores superaram significativamente o valor da referência de laboratório (38,0 mg/dL) no mesmo período (Figura 22).

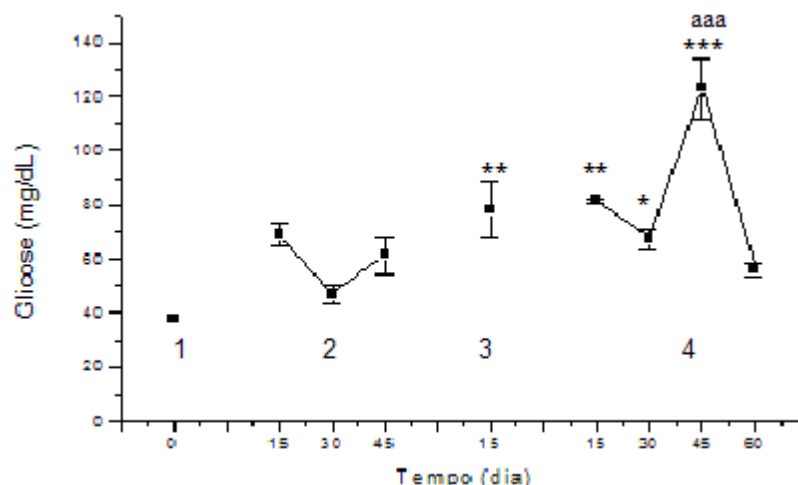


Figura 22. Variação da concentração de glicose do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3 = sítio A (15 dias), 4 = sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*), (\*\*), (\*\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,05$ ; 0,01 e 0,001, respectivamente.

(aaa) = valor significativamente diferente ao do controle de campo para a significância de  $p < 0,001$ .

#### 4.3.5.2 Triacilgliceróis

A concentração de triacilgliceróis até a terceira coleta apresentou tendência de aumento quando, nesta, atingiu o valor de 1083,7 mg/dL  $\pm$  136,5 EPM, resultado significativamente superior ao da referência de laboratório (262,0 mg/dL) e ao do controle de campo (542,1 mg/dL  $\pm$  140,0 EPM) neste período. Na última coleta o valor foi de 683,7 mg/dL  $\pm$  34,3 EPM. A concentração de triacilgliceróis, no sítio A, após quinze dias de exposição, foi de 603,8 mg/dL  $\pm$  65,8 EPM, significativamente superior à do sítio B que foi de 277,7 mg/dL  $\pm$  61,3 EPM (Figura 23).

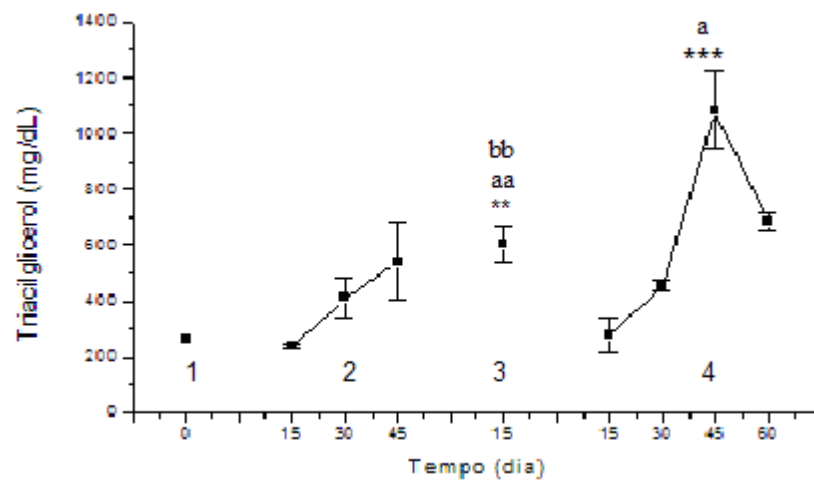


Figura 23. Variação da concentração de triacilgliceróis do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3 = sítio A (15 dias), 4= sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*\*), (\*\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.

(a), (aa) = valor significativamente diferente ao do controle de campo para as significâncias de  $p < 0,05$  e  $0,001$ , respectivamente.

(bb) = valor significativamente diferente ao sítio B para a significância de  $p < 0,01$ .

#### 4.3.5.3 Colesterol total

O colesterol total, no sítio B, apresentou o maior valor na terceira coleta (231,7 mg/dL  $\pm$ 13,9 EPM), resultado significativamente superior ao da referência de laboratório. No final do experimento (sessenta dias), apesar do declínio, o valor de 168,5 mg/dL  $\pm$ 10,6 EPM ainda foi considerado significativamente superior ao da referência de laboratório (108 mg/dL). Na primeira e segunda coleta os valores foram de 136,3  $\pm$ 16,0 EPM e 138,112  $\pm$ 5,0 EPM, respectivamente. A concentração do colesterol total, no sítio A, foi de 170,2 mg/dL  $\pm$ 13,0 EPM, significativamente superior à da referência de laboratório (108,0 mg/dL) (Figura 24). A ausência dos resultados do controle de campo deveu-se a problemas analíticos que inviabilizaram as análises.

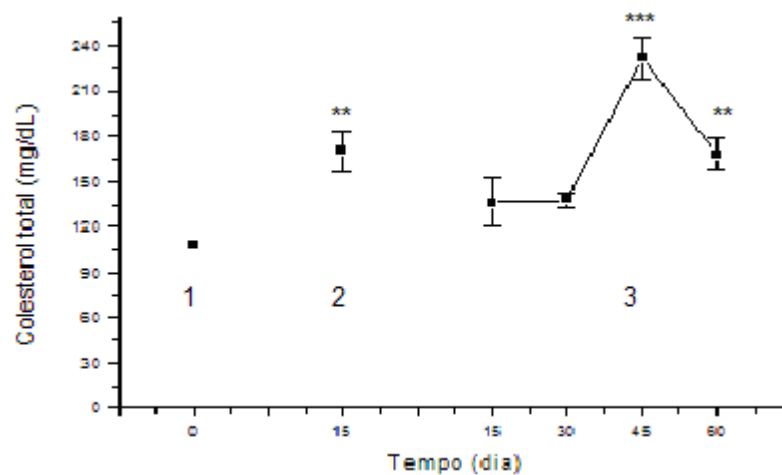


Figura 24. Variação da concentração de colesterol total do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= sítio A (15 dias), 3= sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*\*), (\*\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.

#### 4.3.5.4 Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade (HDL-C)

A concentração do HDL-C, no sítio B, superou de forma significativa a da referência de laboratório na segunda, terceira e quarta coleta. O maior valor,  $231,9 \text{ mg/dL} \pm 42,6 \text{ EPM}$ , foi observado na terceira coleta. Ao término da exposição de sessenta dias sua concentração foi de  $140,2 \text{ mg/dL} \pm 8,4 \text{ EPM}$ , que, apesar da redução, ainda se manteve superior ao resultado da primeira coleta ( $57,5 \text{ mg/dL} \pm 3,1 \text{ EPM}$ ).

A concentração do HDL-C, no sítio A, foi de  $149,5 \text{ mg/dL} \pm 33,0 \text{ EPM}$ , resultado significativamente superior ao do sítio B ( $57,5 \text{ mg/dL} \pm 3,1 \text{ EPM}$ ) e, ao do controle de campo ( $84,1 \text{ mg/dL} \pm 1,1 \text{ EPM}$ ), após quinze dias de exposição, bem como, ao da referência de laboratório ( $58,0 \text{ mg/dL}$ ) (Figura 25).

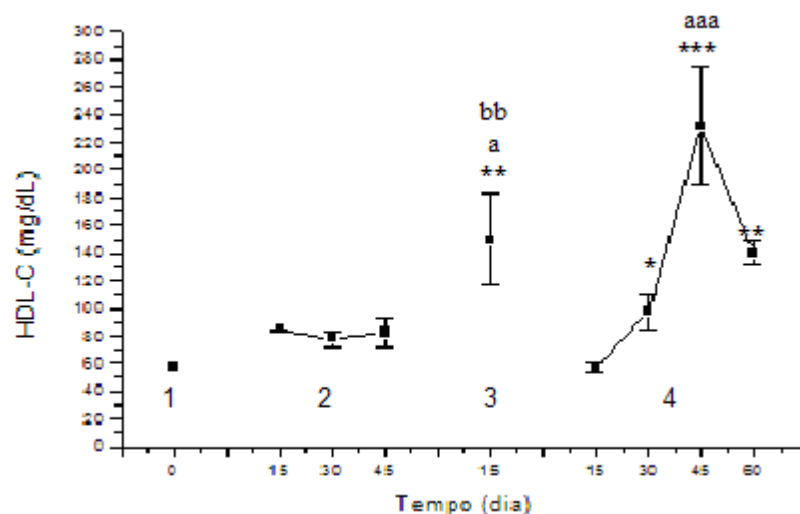


Figura 25. Variação da concentração de HDL-C do grupo dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3= sítio A (15 dias), 4= sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*), (\*\*), (\*\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para as significâncias de  $p < 0,05$ ; 0,01 e 0,001, respectivamente.

(a), (aaa) = valor significativamente diferente ao do controle de campo para as significâncias de  $p < 0,05$  e 0,001, respectivamente.

(bb) = valor significativamente diferente ao do sítio B na primeira quinzena para a significância de  $p < 0,01$ .

#### 4.3.5.5 Colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C)

No sítio B, a concentração de LDL-C apresentou um perfil de declínio constante durante todo o período do experimento. Na primeira coleta sua concentração foi de 51,3 mg/dL  $\pm$  5,9 EPM, ao final da exposição de sessenta dias atingiu a menor concentração (28,3 mg/dL  $\pm$  4,5 EPM). O valor de 36,7  $\pm$  1,12 EPM, referente à terceira coleta foi significativamente inferior ao do controle de campo (113,9  $\pm$  7,2 EPM), no mesmo período.

A concentração do LDL-C, no sítio A, foi de 141,1 mg/dL  $\pm$  52,2 EPM, significativamente superior à do sítio B (51,3 mg/dL  $\pm$  5,9 EPM), após quinze dias de exposição, resultado também significativamente superior ao da referência de laboratório (50,0 mg/dL) (Figura 26).

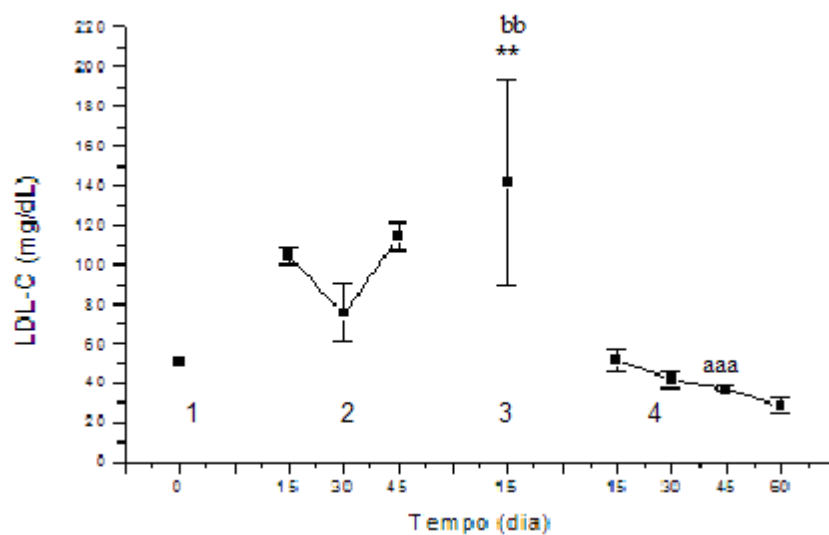


Figura 26. Variação da concentração de LDL-C dos peixes (*O. niloticus*): 1= referência de laboratório (0 dia), 2= controle de campo (15, 30 e 45 dias), 3= sítio A (15 dias), 4= sítio B (15, 30, 45 e 60 dias). Todos os valores são representados em termos de média  $\pm$  EPM.

(\*\*) = valor significativamente diferente ao da referência de laboratório para a significância de  $p < 0,01$ .

(aaa) = valor significativamente diferente ao do controle de campo para a significância de  $p < 0,001$ .

(bb) = valor significativamente diferente ao do sítio B na primeira coleta para a significância de  $p < 0,01$ .

## 5. DISCUSSÃO

A metodologia de exposição dos peixes às águas do Rio Canoas, em gaiolas, demonstrou-se eficiente, pois não ocorreram problemas com as mesmas, nem com os peixes. A maneira pela qual os peixes foram alimentados foi satisfatória conforme observação visual *in loco* e confirmada pelos resultados do índice geral. Índice geral é um parâmetro normalmente utilizado em trabalhos de campo com a finalidade de se avaliar a condição geral do organismo em estudo.

Não houve a interferência ou impacto de outros fatores tais como, por exemplo, a temperatura da água, cujo valor médio foi médio de 21,8°C, e a precipitação pluviométrica, pois não houve variação significativa destes, durante todo o período da realização do experimento. Destaca-se, portanto, que os resultados dos parâmetros bioquímicos deste estudo não sofreram a influência da variação de fatores ambientais naturais, como os citados.

## 5.1 Estudo da qualidade da água com base em parâmetros físico-químicos

Embora as análises físico-químicas, da água do Rio Canoas, não tenham sido realizadas diretamente neste estudo, estas foram efetuadas em estudo paralelo, nos laboratórios da UFSC. Como o resultado destas análises tem implicação direta nos resultados com parâmetros biológicos, estes serão discutidos a seguir, nesta seção.

Os resultados das determinações físico-químicas (condutividade, fenóis totais e sulfetos) das amostras de água do Rio Canoas, obtidos por Paiva (2004) nos mesmos sítios e período onde as gaiolas com os peixes foram colocadas, demonstraram que as alterações na qualidade da água do Rio Canoas são acentuadas, em função da presença da Indústria Klabin. Evidenciaram também que o sítio B, apesar da distância de aproximadamente 5km a jusante do ponto de despejo, ainda está sob forte impacto do efluente despejado no rio. Entre as alterações observadas destaca-se o aumento da concentração dos sulfetos, fenóis totais e condutividade, indicadores de poluição própria da indústria de polpa celulósica, excetuando-se o teor de fósforo total, cuja contribuição do efluente não foi muito acentuada (Tabela 03).

**Tabela 03 - Resultados das análises físico-químicas da água do Rio Canoas no município de Correia Pinto, obtidos por Paiva (2004).**

Pontos de coleta	Data	FENOL AAP (mg/L)	FENOL FOLIN (mg/L)	SULFE-T O (mg/L)	FÓSFORO TOTAL (mg/L)	NITRITO (μ/M)	NITRATO (mg/L)	CONDUTI-VIDADE μS/cm
Sítio A	20/01/03	0.31	0.24	0.04	0.2	0,09	0,79	0.049
Sítio B	20/01/03	0.32	0.34	0.07	0.1	0,10	0,99	0.059
Sítio B	03/03/03	0.33	0.57	0.07	0.3	0,16	0,99	0.052
Sítio B	08/04/03	0.45	0.49	0.11	0.8	0,06	1,01	0.053
Rio das Pombas	08/04/03	0.38	0.36	0.13	0.9	0,16	0,58	0.052
Rio Tributos (foz)	17/05/03	0.36	0,06	0.12	0.09	0,10	0,42	0,044
Despejo Klabin (Fábrica parada)	20/01/03	0.35	0.17	0.08	0.1	0,22	0,74	0.052



Despejo Klabin (Fábrica em funcionamento)	16/05/03	0,45	3,42	1,45	1,66	0,45	0,57	0,410
Local do despejo do efluente (1,5m de profundidade)	16/05/03	0,59	4,01	-	0,33	0,86	0,65	0,272
Sítio Controle	21/03/04	Não detectado	Não detectado	0,05	0,1	Não detectado	Não detectado	0,04

A análise dos mesmos parâmetros no Rio Tributos, afluente do Rio Canoas, com foz anterior ao local de lançamento de rejeitos pela indústria, mas receptor dos despejos domésticos do município de Correia Pinto, demonstrou que naquele rio não há presença dos contaminantes acima referidos, mas sim de elevado teor de fósforo total e de nitrogênio, advêm do lançamento dos despejos domésticos. Desta forma, é compreensível que os níveis de fósforo total e nitrogênio estivessem reduzidos no rio Canoas, em relação ao Rio Tributos que é um rio de pequeno porte.

Também no Rio das Pombas, afluente localizado 3 Km após o local de despejo do efluente, foi observado resultado semelhante ao da água do Rio Tributos com níveis reduzidos de fenóis e sulfetos, além do fósforo total e da amônia. Resultado justificado pelo fato de que este rio não recebe, significativamente, nenhum tipo de despejo doméstico ou industrial. Portanto, o elevado teor de fenóis e sulfetos e da condutividade no rio Canoas foi associado ao lançamento do efluente pela indústria.

Aqui cabe ressaltar que apesar dos resultados da determinação de fenóis, sulfetos e fósforo total indicarem valores inferiores aos do sítio B, no sítio A, neste também foram observadas alterações na citologia e histologia dos fígados e brânquias dos peixes, embora de menor intensidade do que as observadas no sítio B.

A qualidade físico-química da água do sítio controle também foi avaliada por Paiva (2004). Em seus resultados todos os parâmetros analisados nas amostras de água do sítio controle apresentaram valores inferiores aos valores obtidos nos sítios estudados no Rio Canoas. Os resultados auferidos no sítio

controle foram os seguintes: condutividade, 0,04  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; Fenol AAP e fenol Folin, não foram detectados; sulfeto, 0,05 mg/L e fósforo total, 0,1 mg/L (Tabela 3).

## 5.2 Avaliação da qualidade da água com base em parâmetros biológicos

### 5.2.1 Testes de toxicidade aguda

Paralelamente a este estudo, foram desenvolvidos, nos laboratórios da UFSC, testes de toxicidade aguda, com amostras de água dos locais estudados no Rio Canoas e do efluente da indústria de polpa celulósica local.

As respostas destes testes de toxicidade aguda, obtidas por Paiva (2003), utilizando *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* (teste Lumistox), expostos ao efluente da indústria e amostras de água do rio Canoas coletadas nos mesmos sítios deste experimento e no mesmo período deste estudo, não indicaram a presença de efeitos de toxicidade aguda, apesar dos parâmetros físico-químicos terem demonstrado alterações na qualidade da água. A ausência de efeitos agudos contrastou com as respostas biológicas dos testes de toxicidade crônica obtidas no presente estudo, as quais evidenciam claramente a presença de danos celulares, como será discutido adiante. Tal comportamento também foi observado em experimentos de laboratório.

Para Quevedo *et al.* (2001), o emprego de testes que avaliam a toxicidade aguda de diversos poluentes em efluentes industriais permite determinar possíveis impactos que, às vezes, a simples caracterização físico-química da água não revela. Os resultados obtidos neste estudo sustentam a idéia de que a avaliação da toxicidade aguda não é suficiente para a determinação de alterações na qualidade do meio ambiente, quando analisada isoladamente, como bem ilustra este caso.

### 5.2.2 Testes de toxicidade utilizando peixes em gaiolas no Rio Canoas

Neste estudo, as indicações sítio A e B corresponderam respectivamente aos locais de estudo que estão localizados a 10Km a montante do ponto de despejo da indústria, e a, aproximadamente, 5km a jusante do mesmo ponto conforme indicado na metodologia (Figura 04). Estes sítios foram definidos com a finalidade de se avaliar o impacto específico do efluente da indústria de polpa e papel, já que nos sítios pesquisados não há outro tipo de atividade, conforme foi constatado em visitas de campo.

O sítio A foi inicialmente definido como sítio controle do experimento. Contudo, esta escolha não se mostrou adequada porque foram constatadas alterações nos parâmetros pesquisados (bioquímicos, citológicos e histológicos) nos peixes estudados neste local. Tais alterações são indicativas da presença de impacto ambiental também neste sítio. Aqui cabe ressaltar o fato de que existe uma outra indústria de polpa de celulose, também pertencente à Klabin, distante aproximadamente 45 km a montante da Klabin/Celucat. Por esta razão foi estabelecido outro sítio livre de contaminações para a avaliação de um grupo de peixes controle do experimento, *in situ*. Esta etapa foi desenvolvida no ano de 2004, portanto, um ano após o início dos estudos, pois a aproximação do inverno em 2003 impossibilitou que neste ano novos testes fossem realizados.

Também se considerou apropriado utilizar os resultados obtidos em outros estudos no Laboratório de Avaliação Toxicológica da UFSC, para fins de comparação. Tal procedimento se mostra muito interessante, inclusive em termos conceituais, uma vez que nos possibilita validar a metodologia utilizada em laboratório, bem como avaliar a influência de fatores sazonais nos parâmetros em estudo.

Portanto, nesta discussão, foram ressaltados dois enfoques, um que relaciona os resultados entre os dois sítios A e B, e um segundo que considera os dados obtidos no sítio B e os relaciona com os do sítio controle e com o da referência de laboratório da UFSC.

#### **5.2.2.1 Estudo comparativo entre os resultados do sítio A e sítio B**

Para efeitos de comparação entre os sítios A e B, optamos por selecionar, no sítio B, apenas os resultados referentes ao único período de obtenção de amostras no sítio A, por motivos já mencionados. Portanto, os resultados citados neste texto referem-se apenas à primeira coleta, após quinze dias de exposição.

O índice geral dos peixes estudados foi de 4,3 g/cm no sítio A, de 4,2 g/cm no sítio B, e o do controle foi de 5,4 g/cm, após quinze dias de exposição.

Índice geral é um valor cujo cálculo leva em consideração o tamanho e o peso do animal. É considerado um indicador do estado geral do indivíduo, em especial quando o mesmo atravessa todo seu ciclo de vida nas condições em que é avaliado. Em experimentos de longo prazo e com espécies nativas, este índice reveste-se de uma importância muito grande, uma vez que permite demonstrar o quanto as condições ambientais afetam o crescimento e o desenvolvimento das espécies em estudo. As estatísticas têm demonstrado que este índice é diretamente proporcional à qualidade ambiental (HEATH, 1995).

Neste estudo, este parâmetro foi utilizado para se avaliar a condição geral dos peixes no período do experimento, que foi relativamente curto. Além disso, os peixes foram trazidos de outro local. Portanto, a conotação ou significado deste parâmetro para um ou outro tipo de estudo é diferente. Em que pesem estas ressalvas, a diferença observada entre o valor do índice geral dos peixes do controle de campo e o dos peixes dos sítios A e B, indicou que não se pode descartar a influência da qualidade da água na determinação do índice geral dos peixes, mesmo em experimentos de curto prazo. Esta diferença, que é bastante significativa, demonstra, portanto, que no estado geral dos peixes preponderou a qualidade da água como fator determinante, em ambos os sítios.

Em relação às alterações das células sangüíneas e tecidos (fígado e brânquias) estas foram semelhantes nos dois sítios. A análise citológica sangüínea indicou alterações na membrana plasmática e no núcleo, além da presença em maior proporção de eritrócitos imaturos. O tecido hepático apresentou hipertrofia e alterações, como a vacuolização do citoplasma, causadas pela infiltração de lipídios e pelo deslocamento do núcleo. Aqui deve ser destacado que as diferenças entre os dois sítios são de ordem quantitativa e não qualitativa, ou seja, os tipos de danos celulares são semelhantes, a extensão dos danos é que foi diferente, tendo sido, observadas alterações mais pronunciadas no sítio B.

Semelhantes aos resultados deste estudo, existem numerosos relatos de alterações histopatológicas em peixes expostos a poluentes, como, por exemplo, aos organoclorados, organofosforados, carbamatos e fenol. As alterações citadas incluem o aumento de vacúolos no citoplasma e mudanças na forma do núcleo, entre outras (HEATH, 1995).

A análise histológica das brânquias indicou que estas apresentaram hipertrofia do tecido epitelial das lamelas secundárias com fusão das mesmas. Neste sentido, vários estudos histológicos indicaram

que poluentes, tanto inorgânicos como orgânicos, afetam os tecidos das brânquias. Este tipo de alteração induz a redução da difusão de oxigênio para o sangue, e por consequência, causa hipóxia interna, sendo um dos efeitos a elevação do hematócrito (HEATH, 1995). Este resultado pode, portanto, explicar o aumento do hematócrito observado neste estudo, tanto no sítio A como no sítio B, a partir da segunda coleta.

Corroborando os resultados deste estudo, outros também demonstraram que os efluentes de indústrias de papel e celulose podem causar efeitos deletérios em organismos aquáticos, por exemplo, alterações morfológicas em células sangüíneas e modificações fisiológicas e histológicas em fígado (OWENS, 1991). Também em estudos anteriores, nos laboratórios da UFSC, os peixes exibiram alterações muito semelhantes às observadas neste estudo (SOARES *et al.*, 1997).

A hematopoiese em peixes teleóstolos ocorre tanto no fígado quanto no baço. Conforme Heath (1995), vários fatores influenciam os valores da taxa de hemoglobina e concentração do hematócrito de peixes, citando os poluentes químicos, os quais podem responder por aumentos e reduções das medidas dos parâmetros hematológicos. Cita também que, em peixes expostos ao efluente da indústria de polpa celulósica, foram observadas alterações dos parâmetros hematológicos, como por exemplo, anemia. Por outro lado, alterações na quantidade de células sangüíneas e concentração de hemoglobina podem significar apenas um processo adaptativo às condições locais, entre elas a própria disponibilidade de oxigênio.

A concentração de hemoglobina nas amostras do sítio B apresentou tendência regular à redução, após quinze dias de exposição. E somente o resultado da exposição de sessenta dias ( $6,4 \text{ mg/dL} \pm 0,2 \text{ EPM}$ ), foi significativamente inferior ao da referência de laboratório ( $7,4 \text{ mg/dL}$ ). Por problemas analíticos, que inviabilizaram a análise, não apresentamos o resultado do sítio A.

O resultado da taxa do hematócrito, no sítio A, foi de  $29,0\% \pm 0,9 \text{ EPM}$ , valor significativamente superior ao da referência de laboratório ( $23,0\%$ ) e ao do controle de campo ( $22,8 \text{ mg/dL} \pm 0,9 \text{ EPM}$ ), em quinze dias de exposição. Contudo em relação ao sítio B, não houve diferença significativa. Neste período o resultado do sítio B ( $22,9\% \pm 1,4 \text{ EPM}$ ) foi semelhante ao da referência de laboratório, bem como, ao do controle de campo.

Embora a componente devida a fatores ambientais diferentes da presença de poluentes não possa ser descartada, a diferença na taxa de hematócrito pode ser considerada como um efeito tóxico provocado pelo lançamento do efluente. Tal suposição se justifica pelo fato de que, no sítio B, o resultado da primeira coleta apresentou valor semelhante ao da referência de laboratório que foi de 23,0%, diferente das demais coletas. Na mesma direção, estudos de Andersson *et al.* (1998) demonstraram que tanto os valores da taxa do hematócrito assim como os da concentração da hemoglobina em peixes de sítios poluídos por efluentes de papel e celulose sempre foram superiores aos valores observados em peixes não expostos.

A determinação das alterações da atividade enzimática de algumas enzimas plasmáticas como, por exemplo, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), é utilizada para avaliar um possível dano hepático em humanos. Também em peixes este raciocínio é válido. O aumento da atividade destas enzimas no sangue é, em geral, indicativo de dano celular. Como as enzimas são específicas de determinados tecidos, estas podem ser utilizadas como biomarcadores específicos. Neste sentido a ALT, a AST e a FA têm sido utilizadas em análises clínicas tradicionais, como biomarcadores de lesões do fígado e do miocárdio, e a redução da atividade da colinesterase plasmática como indicativo da exposição a agrotóxicos (HEATH, 1995). Estudos com peixes têm demonstrado que mudanças na atividade enzimática são decorrentes de alterações bioquímicas induzidas por poluentes, entre outros, dioxinas e metais (HEATH, 1995).

Nos sítio A e B, no período de quinze dias de exposição, os resultados da atividade da AST, da FA e da Che foram superiores aos da referência de laboratório.

O valor do controle de campo foi superado somente pela colinesterase, tanto no sítio A, como, no do sítio B, na primeira quinzena.

No sítio A, apenas a atividade da  $\gamma$ -GT foi significativamente superior ao resultado do sítio B.

Os valores elevados das enzimas plasmáticas estudadas foram associados com as alterações apontadas na histologia do fígado. Contudo, valores reduzidos da atividade enzimática, em peixes expostos a poluentes por longos períodos (maiores que 6-8 meses), podem ser esperados, já que, em peixes, a atividade destas enzimas plasmáticas, em especial, tem como característica uma elevação inicial seguida de redução. Assim, por exemplo, alguns estudos têm demonstrado que peixes em

ambientes cronicamente poluídos apresentaram níveis plasmáticos de ALT menores do que peixes em ambientes não contaminados (ADAMS, 1990). Por outro lado, resultados anteriores, obtidos em estudos desenvolvidos nos laboratórios de toxicologia da UFSC, demonstraram que a atividade de AST e ALT aumentou em períodos curtos de exposição ao efluente da indústria de papel e celulose, seguida por uma redução de valores em períodos mais prolongados (quatro semanas) (SOARES *et al.*, 2000).

Bucher e Hofer (1990) também apontam que, em peixes, o período de aumento da atividade de enzimas no soro, após intoxicação, mostra-se de rápida duração e não é longo ou permanente como em humanos.

Enzimas hepáticas como a superóxido dismutase (SOD), juntamente com a glutathione peroxidase (GP) e a catalase (CAT) são exemplos de enzimas componentes do sistema enzimático de proteção endógena das células contra os prejuízos provocados por substâncias tóxicas e oxidantes endógenos produzidos pelo seu metabolismo. A avaliação das possíveis alterações nestes níveis enzimáticos permite caracterizar a presença ou não de estresse oxidativo nas espécies animais. Corroborando nossos resultados, alterações hepáticas nestes sistemas foram constatadas, nos peixes deste estudo, a partir de resultados obtidos em estudos desenvolvidos no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória da UFSC, sob a coordenação do professor Danilo Wilhem Filho. As mudanças observadas na concentração dos parâmetros foram: aumento de glutathione reduzida (GSH) e dos níveis enzimáticos evidenciados pelo aumento glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR). Os valores obtidos, em ambos os sítios, foram mais elevados que os do controle (Comunicação pessoal).

Os metabólitos: glicose, triacilgliceróis, colesterol total, HDL-C e LDL-C superaram os valores da referência de laboratório, no sítio A. No sítio B somente a glicose superou a referência de laboratório. Os metabólitos triacilgliceróis e HDL-C, do sítio A, superaram os resultados do grupo controle de campo, na primeira quinzena. Os valores dos triacilgliceróis, do HDL-C e do LDL-C, neste mesmo período, no sítio A, foram significativamente mais elevados que os do sítio B. Este resultado permite, por um lado, supor que existem demandas metabólicas diferentes. Por outro lado, deve-se levar em consideração que a mobilização do colesterol e triacilgliceróis no sangue depende de lipoproteínas, que são produzidas pelo fígado. Portanto, numa disfunção hepática, a biossíntese destes transportadores pode ficar comprometida, alterando seus níveis plasmáticos.

Heath (1995) relaciona indiretamente a mudança na concentração de carboidratos, redução inicial seguida de aumento que exige a mobilização do glicogênio hepático, com o dano às brânquias causado por efluente de polpa de celulose, que leva à hipóxia interna pela redução do oxigênio arterial. Cita, também, que níveis aumentados de glicose sangüínea ocorrem em momentos de estresse e tendem a voltar a valores normais após a adaptação do peixe. Cita, ainda, que hiperglicemia com aumento de 80% na concentração de glicose sangüínea foi observada em peixes expostos ao efluente de polpa de celulose.

Os resultados obtidos na avaliação de defesas antioxidantes em estudos desenvolvidos no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória da UFSC, pelo professor Danilo Wilhlem Filho (Comunicação pessoal), confirmaram os deste estudo, onde as variações dos parâmetros bioquímicos, citológicos e histológicos apontaram para danos em ambos os sítios, A e B. Isto é, a metodologia utilizada conseguiu diagnosticar a existência de impacto ambiental numa região mais ampla que a esperada.

#### **5.2.2.2 Estudo comparativo entre os resultados do sítio B, os do sítio controle e os do grupo referência de laboratório.**

No segundo enfoque foram comparados somente os resultados das amostras do sítio B com os valores do sítio controle, e com os do grupo referência obtidos nos Laboratórios da UFSC.

Conforme já abordado no texto anterior, neste estudo o parâmetro índice geral foi utilizado para se avaliar a condição geral dos peixes no período do experimento. A média do índice geral dos peixes expostos no sítio B foi de 4,6 g/cm, enquanto que o valor médio do controle de campo foi de 6,1 g/cm. Este resultado aponta, portanto, para a influência da qualidade ambiental na condição geral dos peixes.

Como já discutido, as células sangüíneas dos peixes coletados no sítio B apresentaram uma série de alterações morfológicas na membrana plasmática e núcleo. A histologia do fígado e das brânquias, associada às análises bioquímicas e hematológicas confirmou a presença de alterações hepáticas como a hipertrofia e a vacuolização do citoplasma. Entre a primeira e a segunda coleta, as alterações celulares observadas foram bastante intensas, tendo sido atenuadas na terceira e quarta coleta, porém ainda significativas. Estes resultados foram compatíveis com os observados em outros estudos de exposição de



peixes ao efluente BKME, conforme os resultados apresentados por Rosa *et al.*, (2003).

Os resultados demonstraram, portanto, que podem ocorrer alterações celulares e teciduais acentuadas, apesar da ausência de sinais agudos, como a morte.

Conforme Schreck e Moyle (1990), a concentração de hemoglobina e a taxa do hematócrito são índices primários da capacidade de transporte e da habilidade do organismo em suprir o seu requerimento metabólico de oxigênio. Por outro lado, para organismos aquáticos, tais índices dependem da disponibilidade de oxigênio no meio.

A concentração de hemoglobina apresentou valores elevados já na primeira coleta ( $8,1 \text{ mg/dL} \pm 0,09 \text{ EPM}$ ), com tendência constante à diminuição após a segunda coleta, contudo, apenas na quarta coleta sua concentração foi considerada significativamente inferior à da referência de laboratório ( $7,4 \text{ mg/dL}$ ) não apresentando valores significativamente diferentes aos do controle de campo, nos respectivos períodos.

No sítio B, o resultado do hematócrito da primeira coleta ( $22,9\% \pm 1,4 \text{ EPM}$ ) ficou próximo ao valor da referência de laboratório ( $23\%,0$ ) e ao do controle de campo ( $22,8 \text{ mg/dL} \pm 0,9 \text{ EPM}$ ). Os resultados da segunda ( $34,4 \pm 1,3 \text{ EPM}$ ), terceira ( $30,9 \pm 1,2 \text{ EPM}$ ) e quarta ( $28,6 \pm 1,3 \text{ EPM}$ ) coleta superaram o da referência de laboratório. O controle de campo foi superado apenas pelo valor da segunda e terceira coleta, nos períodos correspondentes. Em estudos de laboratório, valores de hematócrito em torno de 34% têm sido observados em peixes (tilápias), submetidos à exposição a efluentes de indústria de papel e celulose, bem como, a níveis elevados de estresse, incluindo estresse por agitação mecânica, (SOARES, *et al.*, 2000). Assim, relacionamos a elevação do hematócrito na segunda coleta, não com o manuseio, transporte ou permanência dos peixes na gaiola, alterações que também seriam visíveis no grupo controle, mas, possivelmente, com o processo de estresse metabólico às condições do meio. A diferença obtida entre os resultados do experimento e os do laboratório se justifica pela oxigenação permanente da água dos aquários, no laboratório, o que resulta no maior aporte de oxigênio aos peixes. Portanto, o aumento da taxa do hematócrito pode estar indicando uma menor disponibilidade de oxigênio, ou uma hipóxia interna por dano branquial.

A taxa do hematócrito apresentou perfil semelhante aos observados em estudos anteriores nos laboratórios de toxicologia da UFSC: aumento seguido de diminuição. Resultado compatível com os

resultados da citologia das células sangüíneas e da histologia das guelras.

Conforme Schreck e Moyle (1990), a manutenção da taxa do hematócrito em valores elevados reflete um aumento na concentração das células ou do seu volume pela entrada de água, ou seja, aumenta o volume mas o conteúdo de hemoglobina permanece constante já que este também mantém uma relação com fatores osmorregulatórios. Esta é uma das reações típicas de estresse, observada nos experimentos de laboratório desenvolvidos na UFSC (SOARES, 2004).

A atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) na primeira ( $85,4 \text{ UI/dL} \pm 12,9 \text{ EPM}$ ) e segunda ( $43,2 \text{ UI/dL} \pm 5,1 \text{ EPM}$ ) coleta apresentou valores significativamente superiores ao da referência de laboratório ( $29,0 \text{ UI/dl}$ ). O resultado foi compatível com a histologia do fígado.

Grizzle e Lovshin (1996) demonstraram a elevação da atividade enzimática da AST em peixes oriundos de águas muito poluídas, ou expostos ao dieldrin, mas consideraram que as mudanças da atividade enzimática foram relativamente pequenas e a relacionaram com a presença de lesões teciduais externas nos peixes. Em humanos, valores elevados da AST são indicativos de danos hepatocelulares graves, já que, nos hepatócitos, 80% desta enzima está localizada nas mitocôndrias.

O nível da ALT plasmática é usado no diagnóstico da função hepática em humanos. Mas também é utilizada como indicativa de danos em outros tecidos além do fígado, como, por exemplo, o rim (JOHNSEN *et al.*, 1995).

Neste estudo, a alanina aminotransferase (ALT) apresentou atividade enzimática significativamente superior à da referência de laboratório somente na terceira e quarta coleta, no sítio B. Na primeira coleta seu valor foi de  $5,4 \text{ UI/dL} \pm 0,9 \text{ EPM}$ , na segunda, foi de  $13,2 \text{ UI/dL} \pm 0,9 \text{ EPM}$ , para, em seguida, no final do experimento, atingir valor de  $11,8 \text{ UI/dL} \pm 0,3 \text{ EPM}$ . Este perfil de variação foi semelhante ao de estudos anteriores de laboratório, aumento seguido da tendência à redução dos valores, destacando-se o fato de que o valor da quarta coleta ainda foi superior ao da primeira e se correlaciona com as alterações histológicas de fígado observadas. Portanto, novamente se confirmou o fato de que alterações histológicas são acompanhadas de aumentos da atividade enzimática da ALT e AST. Considerando-se que a concentração destas enzimas (AST e ALT) é elevada nos hepatócitos, entende-se que o aumento da

permeabilidade da membrana plasmática destes, por necrose ou por inflamação, seja identificado pelo aumento da atividade enzimática plasmática.

A atividade da fosfatase alcalina (FA), no sítio B, durante o experimento apresentou valores significativamente diferentes aos da referência de laboratório (13 UI/dL), na primeira (32,2 UI/dL  $\pm$ 3,8 EPM) e quarta coleta (36,0 UI/dL  $\pm$ 5,4 EPM). Contudo em relação aos resultados do controle de campo nos respectivos períodos não apresentou alterações relevantes.

A atividade da enzima fosfatase alcalina, nos estudos de laboratório tem se mostrado sensível à exposição ao efluente da indústria de polpa celulósica, com tendência ao aumento de sua atividade. Contudo, o perfil e os valores da atividade da fosfatase alcalina das coletas no sítio B e do controle de campo foram semelhantes.

A elevação das transaminases (AST e ALT) nas lesões hepatocelulares é muito marcada, o que normalmente coincide com uma elevação muito pouco nítida da fosfatase alcalina, ao passo que, nas obstruções, as transaminases sobem discretamente enquanto que a fosfatase alcalina se eleva consideravelmente (LAGUNA, 1978).

Os resultados da atividade enzimática da gama glutamil tranferase ( $\gamma$ -GT) não apresentaram diferenças em relação aos do controle de campo. Estudos anteriores, nos laboratórios de toxicologia da UFSC, não detectaram a atividade desta enzima a qual tem sido observada em peixes com neoplasias hepáticas.

A atividade enzimática da colinesterase foi determinada com a finalidade de se descartar a possível influência de agrotóxicos nos resultados deste experimento e não apresentou um perfil definido de aumento ou diminuição. O resultado da primeira coleta foi de 996,0 UI/dL  $\pm$ 119,0 EPM, na segunda, foi de 1246,5 UI/dL  $\pm$  122,8 EPM, na terceira, foi de 690,7 UI/dL  $\pm$ 48,8 EPM e o da quarta coleta foi de 1138,1 UI/dL  $\pm$  56,2 EPM. Esses resultados foram significativamente superiores ao da referência de laboratório (309,0 UI/dL), durante todo o experimento, bem como aos valores do controle de campo nos períodos de trinta e quarenta e cinco dias.

Assim, considerando que o efeito de exposição de peixes e de outros organismos, incluindo o humano, a agrotóxicos do grupo de carbamatos e organofosforados acarreta a redução da atividade plasmática de colinesterase, os resultados da atividade desta enzima nos peixes, neste estudo, parecem indicar que a presença de defensivos agrícolas, quanto a este aspecto, não é importante na região estudada. Por outro lado, pelo fato de esta enzima ser produzida pelo fígado, a diferença entre os valores das médias do grupo controle e as do grupo em exposição no sítio B pode indicar também um dano hepático acentuado.

Em outros estudos que realizamos na serra catarinense foi observada uma redução de 46,7% na atividade da acetilcolinesterase cerebral, em peixes nativos do Rio Canoas, no município de Urubici, região de plantio de hortaliças e com uso maciço de pesticidas.

No contexto geral, considerou-se que os valores das atividades das enzimas plasmáticas pesquisadas apresentaram variações irregulares que precisam ser melhor entendidas. Para tanto, a repetição e aprofundamento do estudo de campo necessita incluir novos parâmetros de análise como, por exemplo, o das proteínas totais.

Os resultados dos metabólitos glicose, triacilgliceróis, colesterol total e HDL-C apresentaram a maior variação na terceira semana, quando foram observados picos nos valores dos mesmos, com exceção do LDL-C que demonstrou uma tendência regular na redução dos valores. O comportamento do nível plasmático dos metabólitos estudados, glicose, triacilgliceróis, colesterol total e HDL-C, pode, por outro lado, indicar adaptações fisiológicas às novas condições ambientais no rio. Estudos citam que peixes expostos a clorofenóis responderam com taxas de metabolismo elevadas. No entanto, a exposição crônica de peixes a fenóis inibiu a conversão do colesterol a hormônios esteróides e causou o aumento da concentração de colesterol no fígado e no sangue (HEATH, 1995). Soares e Moismann, (2000), em experimentos de laboratório, demonstraram que a exposição de peixes ao efluente BMKE promove a redução da concentração plasmática de colesterol.

Níveis elevados de glicose são normalmente encontrados em situações de estresse. Neste caso,

podem apenas estar indicando a adaptação à dinâmica do rio, diferente da dos aquários do laboratório, particularmente no que se refere ao fator correnteza. Resultados obtidos por Jeney *et al.* (1996) demonstram que a concentração de glicose no sangue do *Rutilus rutilus* após exposição aguda (72h) ao BMKE se elevou durante o experimento, de forma semelhante aos resultados deste estudo. No estudo de Andersson *et al.* (1998) o nível alterado de glicose plasmática foi indicativo do metabolismo anormal de carboidratos, possivelmente resultante da alteração hormonal.

Na mesma direção, o aumento de triacilglicerol plasmático pode indicar, também, uma nova condição fisiológica caracterizada por uma maior mobilização energética. Em estudos anteriores desenvolvidos em laboratório, (SOARES *et al.*, 2002), a exposição desta espécie a este tipo de efluente acarretou um aumento da concentração plasmática de glicose, porém redução da concentração de triacilgliceróis.

### 5.2.2.3 Considerações finais

Destaca-se que as enzimas ALT e colinesterase, dos peixes expostos à água do Rio Canoas, apresentaram variação mais intensa na segunda coleta (30 dias). Para as enzimas AST, ALT e FA, nos estudos do laboratório de Ecotoxicologia da UFSC, estas variações aconteceram normalmente no período de quinze dias de exposição. Em relação aos resultados dos metabólitos as variações mais intensas ocorreram na terceira coleta (45 dias).

Considerou-se que as diferenças obtidas entre os resultados do controle de campo e os da referência de laboratório podem ser justificadas pelo fato de que o efluente nas condições de laboratório não sofre as mesmas interações físico-químicas e biológicas que o efluente no meio natural, onde a biota é muito mais rica. Adicionalmente, as flutuações de luminosidade, temperatura, nutriente, entre outros fatores, são muito diferentes entre experimentos de campo e de laboratório. Entretanto, em linhas gerais, os resultados de laboratório e de campo exibiram uma certa correlação que permitiu confirmar o potencial de toxicidade do efluente, considerando as especificidades de cada ambiente.

Também como consequência destes estudos obteve-se a validação da metodologia utilizada em experimentos de laboratório, confirmando sua viabilidade e representatividade na expressão do potencial de toxicidade de efluentes.

Portanto, a avaliação da toxicidade pode e deve complementar o monitoramento e controle baseado em métodos físico-químicos de análise, na tentativa de se melhorar os diagnósticos ambientais e na prevenção de danos ambientais mais drásticos. A inclusão destas metodologias induz a evidências potenciais de se efetuar uma avaliação integrada dos efeitos de poluentes, incluindo os devidos a substâncias desconhecidas, a efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos, conforme Brito *et al.* (2003).

## 6. CONCLUSÃO

As alterações dos biomarcadores histológicos (fígado e brânquias), células sanguíneas, enzimas plasmáticas e metabólitos dos peixes, observadas neste estudo, demonstraram que a metodologia empregada de exposição da espécie *O. niloticus* (tilápia) e de avaliação dos parâmetros biológicos foi sensível para identificar o impacto ambiental no Rio Canoas, receptor do efluente da indústria de polpa de celulose. Portanto, a avaliação da alteração dos parâmetros biológicos selecionados como biomarcadores (tecidos, enzimas e metabólitos) indicaram a existência de condições ambientais adversas no trecho do rio em estudo e a espécie aqui estudada serviu como um sensor biológico válido.

Os elementos levantados nesta avaliação também demonstraram que os parâmetros físico-químicos usuais, previstos na legislação para o monitoramento da qualidade ambiental, não são suficientes para indicar os efeitos nocivos sobre os peixes não refletindo, por si sós, a real condição de qualidade ambiental e de saúde desse ecossistema.

Por outro lado, os dados gerados indicaram que a poluição originada em locais anteriores ao trecho em estudo foi capaz de propagar-se pelo rio, causando danos ambientais, indicados pelas alterações biológicas dos peixes, também constatadas no sítio A, localizado a montante (10 Km) do local do despejo do efluente da Klabin/Celucat e a jusante (40Km) de outra indústria de polpa de celulose, Klabin/Igaras.

É importante salientar que estes resultados de campo validaram tanto os dados obtidos como a metodologia utilizada nos Laboratórios da UFSC em estudos anteriores, pois, na grande maioria, as

alterações dos parâmetros bioquímicos plasmáticos apresentaram perfis semelhantes aos observados nos resultados de laboratório, na caracterização da toxicidade dos efluentes das mesmas indústrias.

Considera-se, portanto, que esta metodologia poderá compor, com outros parâmetros já utilizados, um modelo para o monitoramento da qualidade das bacias hidrográficas do Estado. E que estes resultados certamente deverão contribuir para o surgimento de um banco de dados sobre os parâmetros estudados ainda inexistente na região.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Considera-se que experimentos complementares serão necessários para que se possa entender melhor os efeitos, sobre os peixes, *in situ*, do impacto ambiental do lançamento do efluente da indústria de polpa de celulose.

Portanto, recomenda-se que:

o experimento, com o grupo controle de campo, seja repetido para que sejam confirmados os valores de referência, para esta espécie de peixe;

outros intervalos para a coleta das amostras devem ser testados e comparados com o aqui utilizado como, por exemplo, o semanal, para que se possa compreender melhor a bioquímica e a fisiologia dos peixes, *in situ*;

parâmetros bioquímicos como, por exemplo, a determinação de proteínas plasmáticas totais, seja incluída em novos estudos.

Considera-se, também, que medidas urgentes devem ser tomadas pelos setores envolvidos para a correção das alterações ambientais em curso no referido trecho do Rio Canoas. Estas ações devem visar à preservação deste manancial que influi diretamente na qualidade da água do aquífero Guarani.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMS, S.M. Biological Indicators of Stress in Fish. **American Fisheries Symposium 8**. Bethesda: Maryland, 1990.
- ADMS, S.M. **Early signs of environmental damage and recovery**. Oak Ridge National Laboratory Review. Vol. 27 n.º 3. Summer 1995. Disponível em: <[http://www.ornl.gov/ornl review /rev27-3/text/envmain.htm](http://www.ornl.gov/ornl%20review/rev27-3/text/envmain.htm)>. Acesso em: 04/06/2003.
- ALCESTE, C.C. **An overview of tilapia production systems**. Aquaculture magazine, January/February 2000. vol. 26, n.º 1, p. 45 - 51.
- ALEM, P.S. XXVI CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL. 1.º a 5 de Noviembre de 1998 AIDIS - Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. CEPIS. **Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo na remoção de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e na toxicidade aguda para *Daphnia similis***. São Paulo: Brasil Escola Politécnica da Universidade de São Paulo - Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, 1998.
- ANDERSSON, T., *et al.* **Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached Kraft mill effluents**. Fish Aquatic Science. 45: 1525-1536, (1998).
- ATHENS, J.W., *et al.* **Wintrobe Hematologia Clínica**. Volume I. 1.ª ed. Brasileira. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998.
- AVULSOS MALACOLOGICOS, 2002. **Boletim Informativo do CIEAC**. Ano II, no. 14, Marco de 2002. Disponível em: <http://www.intergate.com.br/malacologia/pesquisa/pesquisa.html>. Acesso em: 12/07/2004.
- AZEVEDO, F.A. (coodenador) CHASIN, A.A.M. (coodenador). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Intertox, 2003.
- BARBOSA, F.A.R., *et al.* **Cartilha Bioindicadores de Qualidade de Água**. Ed. Loicos Ltda. 18pp. Aquatic Ecosystem Health and Management: 4(1); 51-60. Disponível em: <[http://www.aehms.org/4\\_1\\_barbosa.html](http://www.aehms.org/4_1_barbosa.html)>. Acesso em: 17/03/2003.
- BARROS, M. T. L., *et al.* **Introdução a Engenharia Ambiental**. Escola Politécnica da USP. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária. São Paulo SP, 1999.
- Bioagri Toxicologia**. Disponível em: <<http://www.bioagri.com.br/ecotoxicologia.htm#>>. Acesso em: 23/05/2003.
- BASSFELD, J.C. **Centro de Estudos do Mar**. UFRP. Ecotoxicologia. Disponível em: <<http://www.cem.ufpr.br/ecotox.htm#linhas>>. Acesso em: 07/04/2002.
- Biological Indicators of Stress in Fish. **8<sup>th</sup> Symposium of The American Fisheries Society**. Biological Indicators of Stress in Fish. Edited by S. Marshall Adams. Bethesda: Maryland, 1990.
- BOGDANOVA, A.Y., MIKKO, N. Dehydroabietic acid, a major effluent component of paper and pulp industry, decreases erythrocyte pH in lamprey (*Lampetra fluviatilis*) Aquatic Toxicology 43 (1998) 111-120.



BOGÉ, G., ROCHE, H. **In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*)**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 125 (2000) 345-353.

BOORMAN, G.A., *et al.* **Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of national toxicology program pathology working group**. Toxicology Pathology. 25 (2), 202-210 (1997). In: WESTER, P.W., GRINWIS, G.C.M., VETHAAK, A.D., VAN DER VEN, L.T.M., VOS, J.G. **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology**. Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

**BRASIL CHANEL**. Disponível em:

<<http://www.brasilchannel.com.br/municipios/index.asp?nome=santa+catarina&regiao=serrana>>. Acesso em 24/05/2003.

BRITO, M.F., *et al.* **Avaliação Ecotoxicológica de Águas Residuais - Programa na Bacia do Trancão**. Disponível em: <[http://www.apesb.pt/comunicacoes/com\\_12.htm](http://www.apesb.pt/comunicacoes/com_12.htm)>. Acesso em: 20/01/2003.

BUCHER, F., HOFER, R. **Effects of domestic wastewater on serum enzyme activities of Brown Trout (*Salmo trutta*)**. Comp. Biochemical Physiology, Vol. 97C, N.º 2, pp. 381-385, 1990.

BURTON, D.T., *et al.* **Effects of treated bleached Kraft mill effluent on eggs and prolarvae of Striped Bass (*Morone saxatilis*)**. Water Resour. Bull. 19, 869±879 (1983). In: THOMPSON, G., FORSTER, C.F., KAY, M., SWAIN, J., **The Treatment of Pulp and Paper Mill Effluent: a review**. Bioresource Technology 77 275±286 (2001).

CALLISTO, M. **“Diversidade de Macroinvertebrados Bentônicos e sua Utilização Como Indicadores de Qualidade da Água”**. Painel apresentado SBPC. Julho 2000. Projeto de extensão: a UFMG nas escolas UFMG. UFMG ICB/Dept. Biologia Geral Laboratório de Limnologia/ Ecologia de bentos Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/~limnos/bioindicadores.html>>. Acesso em: 15/07/2003.

CAMPBELL, P.M., DEVLIN, R.H. Expression of CYP1A1 in livers and gonads of Pacific salmon: quantitation of mRNA levels by RT-cPCR. *Aquat. Toxicol.* 34 (1996), pp. 4769. In: REES, C.B., McCORMICK, S.D., HEUVEL, J.P.V., LI, W., **Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)**. Aquatic toxicology. Volume 62, Issue 1, 10 January 2003, Pages, 67-78.

CAMPBELL, P.M., *et al.* **Quantization of dose-dependent increases in CYP1A1 messenger RNA levels in juvenile Chinook Salmon exposed to treated bleached-Kraft mill effluent using two field sampling techniques**. Environmental Toxicology Chemistry, 15, 1119-1123 (1996).

CARLBERG, G.E., *et al.* **Environmental impact of organochlorine compounds discharged from the pulp and paper industry**. Paperi ja Puu- Paper och Trä, 4: 337-341, 1987.

CASARETT, DOULLS. **Toxicology: The Basic Science of Poison**. Curtis de Klaassen. 6<sup>th</sup> edition, 2002.

CASTÑEIRA, M.S. **Problemas e Riscos de Contaminación nas Rias Galegas**. Universidade de Coruña. 2000.

CHIESARA, E., *et al.* **Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes**. Aquatic Toxicology. Milan, Italy, 2000.

COCHE, A. G. Lake Kossou Development Project, Ivory Coast, FAO Aquacult, Bull, 6(2/3): 28, 1974.

CONAMA - **CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 20 de 18 de junho de 1986.**

CONTE, L. **Produtividade e economicidade da tilapicultura em gaiola na região sudeste do**

**Estado de São Paulo: Estudo de caso.** Dissertação Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2002.

CORSON, Walter H. **Manual de Ecologia Global.** São Paulo: Agostos, 1996.

COSTA, A.L.M.C. **CLORO: Um Elemento Infernal. Carta Capital n.º 49 de 28/5/97, pág. 68, com o título de “Química de Risco”.** Disponível em: <<http://antonioluizcosta.sites.uol.com.br/cloro.htm>>. Acesso em 17/08/2002.

**CPRH** - Companhia Pernambucana do Meio Ambiente. Roteiro Complementar de Licenciamento e Fiscalização: Indústria de papel e Celulose Recife: 1998. 95p.

DAMATO, M., ALÉM SOBRINHO, P., MORITA, D.M. **Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo na remoção de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e na toxicidade aguda para *Daphnia similis*.** (em CD-Rom). Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental, 26. Gestion ambiental en el siglo XXI Lima : Asociacion Peruana de Ingenieria Sanitaria, 1998. Disponível em: <<http://dedalus.usp.br:4500/aleph/por/usp/usp/prod/full/1012974>>. Acesso em: 16/09/2002.

DAS, R.K.; NANDA, N.K. Induction of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of Fish Heteropneustes Fossilis by Mitomycin C and Paper Mill Effluent. **Mutation Research**, 175: 67-71 (1986).

DELICADO, A.L.R.S.A., PEREIRA, G.A.G., SANTANA, A.P.A. **Métodos Alternativos à experimentação toxicológica** (tema 1).Toxicologia 1998/99. Experimentação em Organismos Inferiores. Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária. Disponível em: <<http://www.frame-uk.demon.co.uk/alternat.htm>>. Acesso em: 22/11/2002.

DEPLEDGE, M.H. **The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools**, in: M.C. Fossi & C. Loeonzo (Eds.), Nondestructive Biomarkers in Vertebrates, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 261-285. (1993).

DE ROSA, C.T., *et al.* **Public health perspectives on dioxin risks: two decades of evaluations.** Human and Ecological Risk Assessment:Vol.8, N.º 2, pp.233-250 (2002).

DEWAILLY, E., AYOTTE,P., SAUVÉ, L, *et al.* **Polychlorinated biphenyl (pcb) and diclorodiphenyl dichloroethylene (dde) concentrations in the breast milk of women in QUEBEC.** Am. J. Public Health 86, 1241-1246 (1996). In: KOSATSKY, T., WEBER, J.P. Using biomarkers to Characterise Contaminant Exposure among Eaters of Great Lakes and St. Lawrence River fish. Environmental Toxicology and Pharmacology 12 (2002) 69/ 74.

DIEZ, M.C., VIDAL, G., VIDELA, S. **Molecular weight distribution of Pinus radiata Kraft mill wastewater treated by anaerobic digestion.** Bioresource Technology 77 (2001) 183±191.

EASTON, M.D.L., KRUYMSKI, G.M., SOLAR, I.I., DYE. **Gentic toxicity of pulp mil effluent on juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) usingflow cytometry.** Water Science Technology, 35:347-355. (1997).

ENERCAM. Eletrosul Centrais elétricas do Sul do Brasil S.A. Usina hidrelétrica Campos Novos: Estudos de controle ambiental e aproveitamento integrado do empreendimento. **RIMA. Relatório de Impacto Ambiental.** Magna Engenharia Ltda. Junho, 1990.

ENGSTRÖM B., *et.* **Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Environmental Research, Section B. Ecotoxicology and Environmental Safety 49, 144-154 (2001).

ENVIRONMENT AGENCY. **Pesticides in the Aquatic Environment - Update of the Report of the National Rivers Authority** - Water Quality Series N.º 26, National Centre for Toxic and Persistent Substances, 1997.

EPA, Office of Compliance Sector Notebook Project Profile of the Pulp and Paper Industry. **Sector Notebook Project. Pulp and Paper Industry**. EPA/310-R-95-015. September 1995 Office of Compliance Office of Enforcement and Compliance Assurance U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC 20460.

**ESTADO DE SANTA CATARINA**. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br/municipios/framesetmunicipios.htm>>. Acesso em 24/05/2003.

FEROLLA, G. **Planejamento Ambiental e Análise de Processos Organizacionais**. MBA em Gestão Ambiental. Fundação Getúlio Vargas. FGV Management. 2003.

FIALHO, M.L. **“O Papel Reciclado” Uma análise de aspectos sociais e ambientais. Programa de pós-graduação em engenharia de produção e sistemas**. Dissertação Mestrado em engenharia. UFSC. Disponível em: <<http://www.eps.ufsc.br/disserta96/mirian/cap2/fig25.htm>>. Acesso em: 09/11/2002.

FONSECA, A.L. **“Avaliação da qualidade da água na bacia fazem rio Piracicaba, SP, através de testes de toxicidade com invertebrados”**. Tese. Programa de Pós-Graduação Hidráulica e Saneamento - EESC/USP, 1997.

FÖRLIN, L., *et al.* Biochemical and physiological effects of pulp mill effluent on fish. In: **Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluent**. Proceedings of the SEPA Conference, Stockholm, 19-21 November, 1991.

GIBBONS, W.N., *et al.* **Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species 2: comparison between responses of trout-perch (*Percopsis omiscomaycus*) and White sucker (*Catostomus commersoni*) downstream of a pulp mill**. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 17, N.º 11. pp 2238-2245, 1998. Setac Press. USA.

GOMES, M.A.F. **Qualidade das águas subterrâneas e suas relações com as atividades agrícolas**. Biológico, São Paulo, v.61, n.2, p.27-30, jul./dez., 1999.

GONÇALVES, G.N.P. **Avaliação do Risco em Toxicologia (G029) - Avaliação e Gestão do Risco em Toxicologia** (tema 6). Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária - Toxicologia 1998/99. Disponível em: <[www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9899/g029.html](http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9899/g029.html)>. Acesso em: 03/05/2002.

GRINWIS, G.C.M., *et al.* **Toxicology environmental chemicals in the flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on the immune system: field, semi-field (mesocosm) and laboratory studies**. Toxicol. Lett. 112-113, 289-301 (2002b). In: WESTER, P.W., GRINWIS, G.C.M., VETHAAK, A.D., VAN DER VEN, L.T.M., VOS, J.G. **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology**. Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

GRIZZLE, J.M., LOVSHIN, L.L. **Injuries and serum activities of fingerling channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) harvested with a turbine pump**. Aquaculture Engineering, Vol, 15, N.º 5, pp 349-357(1996).

GURGEL, J. J. S. **Potencialidade do cultivo de tilápia no Brasil**. Anais do Primeiro Congresso Nordeste de Produção Animal. Fortaleza, 06-11 de dezembro de 1998, 345-352.

HARTL, M.G.J. **Benthic fish as sentinenl organisms of estuarine sediment toxicity**. Bright, M., P.C. Dworschak & M. Stachowitsch (Eds.) The Vienna School of Marine Biology: A Tribute to Jörg Ott. Facultas Universitätsverlag, Wien: 89-100 (2002). Disponível em: <http://www.ucc.ie/ucc/depts/zoology/hartl/chapter.pdf>. Acesso em 20/06/2003.

HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2 Ed. Lewis publishers, Boca Raton New York London Tokyo, 1995.

HEATH, A.G., PRICHARD, A.W. **Effects of severe hypoxia on carbohydrate energy stores and metabolism in two species of fresh-water fish**. Physiol. Zool., 38,325,1965. In: HEATH A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2 Ed. Lewis publishers, Boca raton New York London Tokyo, 1995.

HODSON, P., *et al.* **Evaluation of ecological risks associated with the use of chlorine dioxide for the bleaching of pulp.** AET - Alliance for environmental technology. Disponível em: <[http://www.aet.org/science\\_of\\_ecf/eco\\_risk/sap97sec8.html](http://www.aet.org/science_of_ecf/eco_risk/sap97sec8.html)>. Acesso em: 22/06/2003.

HODSON, P.V., *et al.* Review of biochemical, physiological, pathological and population responses of white sucker to BKME in St. Maurice river, Quebec. In **Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluent. Proceedings of the SEPA Conference**, Stockholm, 19-21 November, 1991.

HOLOWENKO, F. **Issues Concerning Aquatic Environments.** Bleached Kraft mill effluent (BKME). Disponível em: <<http://sciwebserver.science.mcmaster.ca/biology/2001-2002/3u03-4s03/fh6.htm>>. Acesso em: 04/08/2003.

HOPPE, J.M., SCHUMACHER, M.V. **Uma floresta e uma água.** Porto Alegre: Palletti, 1998.

HOWELL, W.M., BLACK, A., BORTONE, S.A. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*, exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Coepia* 1980:676-681, (1980). In: LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents.** Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

HU, B. T. **Cage culture development and its role in aquaculture in China.** *Aquaculture Fish. Manage.*, 24: 305-310, 1994.

HUISMAN, E. A., KOMEN, J., RUANE, N. M. **Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement.** *Journal of Fish Biology* (2001) 59, 112

HUSSEIN, S.Y.; EL-NASSER, M.A.; AHMED, L.. Comparative studies on the effects of herbicide Atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthys auratus* at Assiut, Egypt. **Bulletin of Environmental Contaminants and Toxicology**, 57: 503-510, 1996.

**IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística1.htm.** Disponível em <<http://www.sdm.sc.gov.br/>>. Acesso em: 21/01/2003.

IGARASHI, M.A. **Cultivo de tilápia.** Disponível em: <<http://www.geocities.com/ctaufc/tilapia.htm>>. Acesso em 17/07/2003.

IWAMA G.K., GREER, G.L., LARKIN, P.A. **Changes in some hematological characteristics of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in response to acute exposure to dehydroabietic acid (DHAA) at different exercise levels.** *J. fish. res. bd. can.*, 33,285,1976. in heath a.g. water pollution and fish physiology. 2 Ed. Lewis publishers, Boca raton New York London Tokyo, 1995.

JANZ, D.M.; MCMASTER, M.E.; WEBER, L.P. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent - **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 58(3): 620-625, 2001.

JENEY, Z., VALTONEN, E.T., JENEY, G., JOKINEN, E.I., Effects of Pulp and Paper Mill. Effluent (BMKE) on Physiology and Biochemistry of the Roach (*Rutilus rutilus* L.). *Archives in Environmental Contamination and Toxicology*. 30, 523-529, 1996.

JOHNSEN, K., *et al.* **Uptake and eliminations of resins acids and physiological responses in Rainbow trout exposed to total mill effluents from an integrated newsprint mill.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 14, N.º 9, pp.1561-1568, 1995.

KARELS, A.; OIKARI, A. Effects of pulp mill effluents on the reproductive and physiological status of perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus urtilus* L.) during the spawning period. **Annals of Zoology Fennicia** 37 (2): 65-77, 2000.

KARR, J.R., P.R. YANT, K.D., SCHLOSSER. **Spatial and temporal variability of the index of biotic**



**integrity in three Midwestern streams.** Transactions of the American Fisheries Society (1987)116:1-11  
In: THOMAS, P. Molecular and Biochemical Answers of Fish goes and Stressors and it the Uses Potential of them / of them Monitoring Environmental. The University of Texas Marine Science Institute Port Aransas, Texas 78373, USA

**KENDALL, R., DICKERSON, R., GIESY, J. Principles and process for avaluating endocrine disruption in wildlife ed. SETAC, Society of Envinronmental Science Technology, v. 18(8): 236A-248A, 1998.**

KOHLER, A., BAHNS, S., VAN NOORDEN, C.J.F. **Determination of kinetic properties of G6PDH and PGDH and the expression of PCNA during liver carcinogenesis in coastal flounder.** Mar. Environ. Res. 46,179-183 (1998). In: WESTER, P.W., GRINWIS, GC.M, VETHAAK, A.D., VAN DER VEN, L.T.M., VOS, J.G. **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology.** Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

KOSATSKY, T., *et al.* **Risks and benefits related to consumption of St. Lawrence River sport fish.** Final report: Montréal Québec, Canada: Direstion Régionale de la Santé Publique, pp. 50-79 (1999). In: KOSATSKY, T., WEBER, J.P. **Using biomarkers to characterise contaminant exposure among eaters of Great Lakes and St. Lawrence River fish.** Environmental Toxicology and Pharmacology 12 (2002) 69/ 74.

KOSATSKY, T., WEBER, J.P. **Using biomarkers to characterise contaminant exposure among eaters of Great Lakes and St. Lawrence River fish.** Environmental Toxicology and Pharmacology 12 (2002) 69/ 74.

KRINSTAD, K.P., LINDSTROM, K. Spent liquors from pulp bleaching. **Environmental Science Technology**, 18(8):236A-248A, 1984.

KRUZZYNSKI, G.M., WILSON, J.Y., ADDISON, R.F. **Experimental exposure of juvenile Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) to bleached Kraft mill effluent: hepatic CYP1A induction is correlated with DNA adducts but not with organochlorine residues.** Aquatic Toxicology 53 (2001) 49-63.

KURT, D.F., *et al.* Fish Communities as Indicators of Environmental Degradation. in **“Biological Indicators of Stress in Fish” 8<sup>th</sup> Symposium of The American Fisheries Society** Ed. Adams, S.M., Bethesda, Maryland, USA, p. 8:123-144, 1990.

LACROIX, G.L, HOOD, D.J., RAND, T.G. **Plasma electrolytes, gill aluminum content, and gill morphology of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) indigenous to acidic streams of Nova Scotia.** Can. J. Zool. 68: 1270-1280, 1990.

LAGUNA, J. **Bioquímica.** Editora Mestre Jou. São Paulo, 1978

LANDNER, L., *et al.* **A field study of environmental impacts at a bleached Kraft pulp mill site on the Baltic sea coast.** Ecotoxicology and Environmental, safety 27, 128-157 (1994).

LeBLANC, G.A. **Are Environmental Sentinels Signaling?** Commentary. Environmental Health Perspective 103:888-890 (1995)

LEHTINEN, K.J.. Environmental Effects of Chlorine Bleaching - Facts neglected? **Paperi Ja Puu - Paper and Timber**, 74 (9):715-719, 1992.

LEHTINEN, K.J., *et al.* **Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival and offspring of Brown trout (*Salmo trutta lacustris*).** Ecotoxicology and Environmental Safety. 42 pp 40-49 (1999).

LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine**

**effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents.** Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

LEMAIRE. LEMAIER. **Meio ambiente para todos.** 1975. Disponível em:  
[http://www.meioambiente.org.br/beaba/beaba\\_b.asp](http://www.meioambiente.org.br/beaba/beaba_b.asp). Acesso em: 10/07/2002.

LENGUEN, C., *et al.*. **Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture.** Aquatic Toxicology 48 (2000) 165-176.

LIVINGSTONE, D.R. **Biochemical measurements. Pages 81-132 in B.L. Bayne and nine coauthors. The effects of stress and pollution on marine animals.1985.** In “Biological Indicators of Stress in Fish” 8<sup>th</sup> Symposium of The American Fisheries Society Ed. Adams, S.M., Bethesda, Maryland, USA, p. 9-28, 1990.

LUXON, P.L., *et al.* **Impact of low-level sampling stress on interpretation of physiological responses of white sucker exposed of effluent from a bleached Kraft pulp mill.** Ecotoxicology and environmental safety 27,251-264 (1994).

MACEDO, J.A.B., **Águas e saúde.** Ortofarma Laboratório de Controle da Qualidade. Brasil, 2000.

MCLATCHY, D., *et al.* **Exposure to *b*-sitosterol alters the endocrine status of Goldfish differently than 17 *b*-estradiol.** Environmental Toxicology and Chemistry, 16,(9):1895-1904, (1997).

MALINS, D.C., OSTRANDER, G.K. **Aquatic Toxicology : molecular, biochemical, and cellular perspectives.** Edited by: Lewis Publishers Boca raton New York London Tokyo, 1994.

MARTINSEN, K., KVERNHEIM, A.L., CARLBERG, G.E. (1991) **The distribution of organohalogen in sediments outside pulp mills using sum parameters. In Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluent.** Proceedings of the **SEPA** Conference, Stockholm, 19-21 November, 1991.

MATTHIESSEN,P., *et al.* Estrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus*) from United Kingdom estuarine and marine waters.Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Science Series Techn.Report No.107. Lowestoft. 1998. In: LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents.** Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

MATTSOFF, L., NIKINMAA, M., 1987. **Effects of plasma proteins on the dehydroabietic acid-induced red cell breakdown.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 14, 157163. Ann. Zool. Fenn. 19, 6164 in BOGDANOVA, A.Y., MIKKO, N. Dehydroabietic acid, a major effluent component of paper and pulp industry, decreases erythrocyte pH in lamprey (*Lampetra fluviatilis*) Aquatic Toxicology 43 (1998) 111120. In: BOGDANOVA, A.Y., MIKKO, N. Dehydroabietic acid, a major effluent component of paper and pulp industry, decreases erythrocyte pH in lamprey (*Lampetra fluviatilis*) Aquatic Toxicology 43 (1998) 111120.

MATTSSON, K., *et al.* **Effects of Pulp Mill Effluents and Restricted Diet on Growth and Physiology of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Environmental Research, Section B. Ecotoxicology and Environmental Safety 49, 144-154 (2001).

MCLEAVY, D.J. Effects of a 12-hr and 25-day exposure to Kraft pulp mill effluent on the blood and tissues of juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Bd. Can., 30, 395, 1973. In: HEATH A.G. Water Pollution and Fish Physiology. 2 Ed. Lewis publishers, Boca Raton New York London Tokyo, 1995.

MCLEAVY, D.J., BROWN, D.J. **Effects of cute exposure to bleached Kraft pulp mill effluent on carbohydrate metabolism of juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during rest and excise.** J. Fish. Res. Can., 32, 753,1975. In HEATH A.G. Water Pollution and Fish Physiology. 2 Ed. Lewis publishers, Boca Raton New York London Tokyo, 1995.

MCCARTY, L.S., POWER, M., MUNKITTRICK, K.R. **Bioindicators Against Biomarkers in Rate of Risk.**

Ecological Human and Ecological Risk Assessment: Vol.8, N.º 1, pp.159-164 (2002).

MCMMASTER, M.E., VAN DER KRAAK, G.J., MUNKITTRICK, K.R. **An epidemiology avalua the biochemical basis for the steroid hormonal depressions in fish exposed to industrial wastes.** Journal of Great Lakes Research, 22:153-171 (1996).

MELLANEN, P., *et al.* Wood-derived estrogens. **Studies in-vitro with breast cancer cell lines and in-vivo in trout.** Toxicol. Appl. Pharmacol.136,381-388. (1996). In: LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents.** Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

MELETTI, P.C. **Avaliação da qualidade da água e do sedimento na bacia do rio Piracicaba, SP, através de parâmetros ecotoxicológicos.** 1997. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental - EESC/USP.

MELETTI, P.C. **“Biomonitoramento nas bacias dos rios Piracicaba e Mogi Guaçu, SP, através de testes de toxicidade com peixes”.** Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental - EESC/USP. Disponível em: <http://www.bioagri.com.br/ecotoxicologia.htm>. Acesso em 7/4/02.

MIKAELIAN, I., *et al.* Health of the White fish of lake (*Coregonus clupeaformis*) with high levels of environmental pollutants. **SETAC.** Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 21, N.º 3, pp, 532-541, 2002.

MILLER, W.R., HENDRICKS, A.S, and CAIRNS, J., JR. **Normal ranges for diagnostically important hematotological and blood chemistry characteristics of rainbow trout (*Salmo gairndneri*).** Can. J. Fish. Aquatic. Sci., 40, 420, 1983. In: HEATH A.G. Water Pollution and Fish Physiology. 2 Ed. Lewis publishers, Boca raton New York London Tokyo, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA. **Guia de vigilância epidemiológica** - Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos. Específicos. Capítulo 5. 1999/2000.

MIRANDA, Z.B. AMBIENTE, DESENVOLVIMENTO e SAÚDE. **Revista CFMV**, Brasília/DF, Ano VI, n.º 21, Set/Out/Nov/Dez2000.

MOORE, A.; WARING, C.P. **Mechanistic effects of a Triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) parr.** Pesticide Biochem. and Physiology, 62: 41-50, 1998.

MUNA ALI, T.R. SREEKRISHNAN. **Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review.** Advances in Environmental Research 5 (175\_196), (2001).

MUNKITTRICK, K.R., *et al.* **Impact bleached Kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum steroid levels of a Lake Superior whitw sucker (*Catostomus commersoni*) population.** Canadian Journal of Fisheries e Aquatic Science. 48:1371-1380 (1992).

MUNKITTRICK, K.R., *et al.* Reproductive dysfunction and MFO activity in three species of fish exposed to bleached Kraft mill effluent at Jackfish Bay, lake Superior. **Water Pollution Research Journal Canada**, 27(3):439-446 (1992).

MUNKITTRICK, K.R., KRAAK, G.J.V. Receiving water environmental effects associated with discharges from Ontario pulp mills. Pulp & Paper Canada, 95(5):57-59 (1994).

MUNKITTRICK, K.R., *et al.* **Environmental impacts of pulp and paper wastewater: Evidence for a reduction in environmental effects at North American pulp mills since 1992.** Water Sci. Technol. 35, 329±338 (1997).

NASCIMENTO, I.A. Instituto de Biologia. Universidade Federal da Bahia. Novos paradigmas da

ecotoxicologia, resultados de testes ecotoxicológicos requerem validação em campo? In Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 5.º ECOTOX \_ Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1.º COBAN - Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. CTTMAR - Centro de Educação. UNIVALI - 5 a 8/10/1998. **ANAIS**. Itajaí-SC.

OIKARI, A.O.J., NAKARI, T. **Kraft pulp mill effluent components cause liver dysfunction in trout**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 28, 266±270 (1982). In: THOMPSON, G., FORSTER, C.F, KAY, M., SWAIN, J., **The treatment of pulp and paper mill effluent: a review**. ELSEVIER. Bioresource Technology 77 275±286 (2001).

OIKARI, A., KUNNAMMO-OJALA, T., **Tracing of xenobiotic contamination in water with the aid of fish bile metabolites: A field study with caged rainbow trout (*Salmo gairdneri*)**. Aquatic Toxicology, 9 (1987) 327-341.

OWENS, J.W. **The Hazard Assessment of Pulp and Paper Effluents in the Aquatic Environment: a review**. In Environmental Toxicology and Chemistry Volume 10. pp1551-1540 (1990).

OWENS, J.W. The Hazard Assessment of Pulp and Paper Effluents in the Aquatic Environment: a review. Environ. Toxicology Chemistry, 10, 1511-1540. (1991). In: RISSANEN, E., KRUMSCHANABEL, G., NIKINMAA, M., **Dehydroabietic acid, a major component of wood industry effluents, interferes with cellular energetics in rainbow trout hepatocytes**. Aquatic Toxicology. Volume 62, Issue 1, 10 January 2003, Pages 45-53.

PAIVA, A.B. Avaliação de risco ambiental utilizando parâmetros físico-químicos e biológicos no Rio Canoas/SC. Dissertação apresentada no programa de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina \_ UFSC, Florianópolis, SC, 2004.

PARROT, J.L., *et al.* Isolation of MFO inducers from tissues of white suckers caged in bleached Kraft mill effluent. **Chemosphere** 41(7): 1083-1089, 2000.

PEDROSA, R.C., *et al.* Effect of bleaching eucalyptus Kraft pulp effluent from a brazilian industry on the expression of cytochrome P4501A1 of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Proceedings of The Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of the Lignins and Others Wood Components**. p. 449-453, 1997.

PEDROSA, R.C., *et al.* Monitoramento do estuário do Rio Itajaí-açu/SC, utilizando a indução do citocromo P4501A e glutathione S-transferase de bagres como biomarcadores. In: **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos (Moraes, R.; Crapez, M.; Pfeiffer, W.; Farina, M.; Bainy, A. & Teixeira, V., eds.)** p. 35-48. Editora Arte & Ciência Vilipress, São Paulo, 2001.

PELLISERRO *et al.*:J. Steroid Biochem.Mol.Biol.44 263 (1993). In: TAKATSUKI, A., YAMAGUCHI, I. **Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical** compounds. RIKEN Review No. 42 (December, 2001): *Focused on Ecomolecular Science Research*.

PEREZ, A.C.A., PAIVA, A.J.T.R. **Manual de técnicas laboratoriais: hematológicas e histopatológicas para peixes**. 1991.

Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 5.º ECOTOX - Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1.º COBAN - Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. CTTMAR - Centro de Educação. UNIVALI - 5 a 8/10/1998. ANAIS - Itajaí - SC.

QUEVEDO, A., BAZAÑEZ, L.I., BARBARIN, M.P. **El árbol como matéria prima**. 17/01/2001. Disponível em: <<http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/materia/industrial/libro-12.pdf>>. Acesso em: 09/11/2002.

Química e meio ambiente. **Introdução à química em engenharia ambiental**. Disponível em: <<http://www.ambiquim.hpg.ig.com.br/ambiental.htm>>. Acesso em 29/05/2003.

**RAND, G.M.** Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. **Second edition. United States of America: Edited by Gary M. Rand. Taylor & Francis, 1995.**



RAND, G.M., WELLS, P.G., McCARTY, L.S. Introduction to Aquatic Toxicology. P. 3-70. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Second edition. Edited by Gary M. Rand. Taylor & Francis, 1995, United States of America. In: RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Second edition. United States of America: Edited by Gary M. Rand. Taylor & Francis, 1995.

RAPOSO, J.B. **Metabolismo e mecanismos de ação de compostos hepatotóxicos**. Seminário apresentado na Disciplina de Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-Graduação da UFRGS. 2002. Disponível em: <[www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad/BTA/xenobioticos.pdf](http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad/BTA/xenobioticos.pdf)>. Acesso em: 02/05/2003.

REDISKE, R., *et al.* **Preliminary Investigation of the Extent of Sediment Contamination in Manistee Lake**. U.S. Environmental Protection Agency. Great Lakes Contaminated Sediments. Julho 2001. Disponível em: <[www.epa.gov/glnpo/sediment/Manistee/rpt17.pdf](http://www.epa.gov/glnpo/sediment/Manistee/rpt17.pdf)>. Acesso em: 20/07/2003.

REES, C.B., McCORMICK, S.D., HEUVEL, J.P.V., LI, W., **Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. Aquatic toxicology. Volume 62, Issue 1, 10 January 2003, Pages, 67-78.

REIGOTA, M. **O QUE É EDUCAÇÃO AMBIENTAL**. São Paulo: Brasiliense, 1994. p.62.

RIBEIRO, L., *et.* Estresse Oxidativo em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) Exposta ao Efluente de Indústria Têxtil. In: **Ecotoxicologia Perspectivas Para o Século XXI** (Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Neto, A.L.O., eds.), p. 441-449. Rima Editora, São Carlos, SP, 2000.

RISSANEN, E., KRUMSCHANABEL, G., NIKINMAA, M., Dehydroabietic acid, a major component of wood industry effluents, interferes with cellular energetics in rainbow trout hepatocytes. Aquatic Toxicology. Volume 62, Issue 1, 10 January 2003, Pages 45-53.

ROEX, E.W. M., KEIJZERS, r., VAN GESTEL, C.A.M. **Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion**. Aquatic Toxicology. Volume 64, Issue 4 , 10 September 2003, Pages 451-460.

ROSA, A.B., *et al.* **Oxidative Stress in a Fish Species exposed *in situ* to Effluents of a Brazilian Pulp and Paper Industry**. Livro de resúmenes. Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Society of Environmental Toxicology and Chemistry. VI Congresso SETAC, 20-23 octubre 2003. Buenos Aires, Argentina.

ROSA, J. **Avaliação da atividade mutagênica de efluentes de indústrias de celulose determinada por ensaio de curta duração com *Salmonella typhimurium*: teste de Ames**. DEDALUS. São Carlos, 1997. Dissertação. EESC Escola de Engenharia de São Carlos. Disponível em: <<http://dedalus.usp.br:4500/aleph/por/usp/usp/tes/set-mail///0934033>>. Acesso em: 06/04/2003.

SANDSTRÖM, O., NEUMAN, E., KARÅS, P. Effects of bleached pulp mill effluents on growth and gonad function in Baltic coastal fish. Wat.Sci.technol.20:107-118, (1988). In: LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents**. Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

SANTA CATARINA. Decreto N.º 14.250, de 5 de junho de 1981.

SANTA CATARINA. Lei n. 5.937 de 15 de junho de 1980.

SANTA CATARINA. Lei Estadual nº 10.949 de 09 de novembro de 1998.

SANTA CATARINA. Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. **Bacias Hidrográficas de Santa Catarina: geral de diagnóstico**. Florianópolis, 1997.

SCHINDLER, D.W. **Sustaining aquatic ecosystems in boreal regions**. Conservation Ecology [online] 2

(2): 18, (1998). Disponível em: <<http://www.consecol.org/vol2/iss2/art18>>. Acesso em: 28/04/2003.

SCHRECK, C.B., MOYLE, P.B. **Methods for Fish Biology**. Maryland, USA: American Fisheries Society Bethesda, 1990.

**Scripta Nova Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales.**

Universidad de Barcelona ISSN: 1138-9788. Depósito Legal: B. 21.741-98

Vol VI, n.º 111, 1 de abril de 2002. Disponível em: <http://www.ub.es/geocrit/sn/sn-111.htm> Acesso em 17/08/2002.

SIBLEY, P.K., *et al.* Environmental Health Assessment of Benthic Habitat Adjacent to a Pulp Mill Discharge. In **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. Vol.32. pp274-284, (1997).

SILVA, F.C. **Avaliação de Biomarcadores**. Laboratório de Biologia da Conservação. Departamento de Biologia, Universidade Évora. Disponível em <http://evunix.uevora.pt/~fcs/Biomarcadores.htm>. Acesso em 05/05/2003.

SINNHUBER, R.M., WALES, J.H., AYRES, J.L., *et al.* **Dietary factors and hepatoma in rainbow (Salmo gairdneri)**. 1. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs. J. Natl. Câncer Inst. 41, 711-718 (1968). In: WESTER, P.W., GRINWIS, G.C.M., VETHAAK, A.D., VAN DER VEN, L.T.M., VOS, J.G. **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology**. Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

SMITS, J., WOBESER, G., SCHIEFER, B. **Physiological, reproductive and pathological effects of dietary bleached pulp mill effluent on Mink (Mustela vison)**. Environmental Toxicology and Chemistry. 14 (12) pp 2095-2105, (1995).

SOARES, C.H.L., *et al.* Histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to pulp bleaching effluent. **Caderno de Resumos do International Symposium on Biology of Tropical Fishes**, Manaus, p. 116, 1997.

SOARES, C.H.L.; DURÁN, N. Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E1 effluent by *Trametes villosa*. **Environmental Technology** v. 19, p. 883-891, 1998.

SOARES, C.H.L.; DURÁN, N. Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained into E1-pulp bleaching effluent by fungal treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 82, n.3, p. 956-968, 2001.

SOARES, C.H.L., WILHELM FILHO, D., PEDROSA, R.C. Avaliação da toxicidade crônica de efluentes de indústria de papel e celulose em tilápia: alterações histológicas em fígado e brânquias in Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 5.º ECOTOX - Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1.º COBAN - Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. CTTMAR - Centro de Educação. UNIVALI - 5 a 8/10/1998. **ANAIS**. Itajaí-SC.

SOARES, C.H.L., BAPTISTA, I.E., MOISMAN, A.L. Alterações Hematológicas em Tilápias Expostas a Efluente de Indústria Têxtil. In: **Ecotoxicologia - Perspectivas Para o Século XXI** (Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Neto, A.L.O., eds.), p. 463-470. São Carlos SP: Rima Editora, 2000.

SOARES, C. H. L., MOSIMANN, A. L. Estudo Comparativo Da Toxicidade De Efluentes De Indústrias De Papel E Celulose Utilizando Parâmetros Bioquímicos em Ecotoxicologia: **Perspectivas para o Séc. XXI**, Editado por Evaldo Gaeta Espíndola ; Clarice Maria Rispoli Botta ; Paschoal ; Odete Rocha ; Maria Beatriz Camino Bohrer & Abílio Lopes de Oliveira Neto. São Carlos SP: Editora RIMA, 2000. pg . 471-482.

SOARES, C.H.L. **"Papel e celulose, Biotecnologia e Meio Ambiente"**. Florianópolis SC: Edit. Seloverde, 2004. No prelo.

SÖDERGREN, A. **Bleached Pulp Mill Effluents; Composition, fate and effects in the Baltic Sea: Swedish**. Environmental Protection Agency Report 4047(1993).

SÖDERGREN, A., *et al.* Biological effects of bleached pulp mill effluents. Swedish Environmental Protection Agency Report 3558 (1989).

SOIMASUO, R.M **The effects of Pulp and Paper Mill Effluents on Fish: a biomarker approach.** Biological research reports from the University of Jyväskylä, 1997.

SPERANDIO, L.M. EMBRAPA. **Embrapa Arroz e Feijão.** Criação de tilápias em tanques. Especialização em Piscicultura na UFG. GO. Disponível em: <[www.aquiculturafb.hpg.ig.com.br/artigo01.htm](http://www.aquiculturafb.hpg.ig.com.br/artigo01.htm)>. Acesso em 21/07/2002.

STEWART, P., *et al.* **Assesment of prenatal exposure to PCBs from maternal consumption of fish: an analysis of PCB patterns and concentration.** Environ. Res. 80, S87-S96 (1999). In: KOSATSKY, T., WEBER, J.P. **Using biomarkers to characterise contaminant exposure among eaters of Great Lakes and St. Lawrence River fish.** Environmental Toxicology and Pharmacology 12 (2002) 69/ 74.

SUNTIO, L.R.; SHIU, W.Y.; MACKAY, D. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. **Chemosphere** v.17, n. 7, p. 1249-1290, 1988.

SUWANASART, P. **Effects of feeding, mesh size and stockings size on the growth of *Tilapia aurea* in cages.** Annu. Rep. Int. Cent. Aquaculture, Auburn Univ., 1971: 71-79.

TAKATSUKI, A., YAMAGUCHI, I. **Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical compounds.** RIKEN Review No. 42 (December, 2001): *Focused on Ecomolecular Science Research.*

TALKA, E.; PRIHA, M. Fractionation and identification of some biologically active compounds in bleached Kraft mill effluents. **Paperi já Puu - Paper och Trä.** v. 3, p. 221-228, 1987.

TAVENDALE, M.H., *et al.* **Bile analysis of goldfish (*Carassius auratus*) resident in a New Zealand hydro lake receiving a bleached Kraft mill discharge.** Chemosphere 33:11, 2273-2289, (1996). In: LEHTINEN, K.J., TANA, J. **Review of endocrine disrupting natural compounds and endocrine effects of pulp and paper mill and municipal sewage effluents.** Environmental Protection. The Finnish Environment 447. Helsinki, 2001.

THOMAS, P. **Molecular and Biochemical Answers of Fish goes and Stressors and it the Uses Potential of them / of them Monitoring Environmental.** The University of Texas Marine Science Institute Port Aransas, Texas 78373, USA (1987).

THOMAS, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring in "Biological Indicators of Stress in Fish" **8<sup>th</sup> Symposium of The American Fisheries Society** Ed. Adams, S.M., Bethesda, Maryland, USA, p. 9-28, 1990.

THOMAS, P., WOFFORD, H. **Effects of metal and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in mullet *Mugil cephalus*.** Toxicol. Appl. Pharmacol., 76, 1272, 1984.(1984). In: HEATH A.G. **Water Pollution and Fish Physiology.** 2 Ed. Lewis publishers, Boca raton New York London Tokyo, 1995.

THOMAS, P. and JUEDES, M. **Influence of lead on the glutathione status of Atlantic croaker tissues.** Aquat. Toxicol., 23, 11, 1992. In: HEATH A.G. **Water Pollution and Fish Physiology.** 2 Ed. Lewis publishers, Boca raton New York London Tokyo, 1995.

THOMAS P.R.S.C., NEFF, J.M. Biochemical responses and alterations of tissue ascorbic acid and glutathione content. Pages 155-180, (1987), *in* C.S. Giam and L.E. Ray, editors. Pollutant studies in marine animals. In "Biological Indicators of Stress in Fish" **8<sup>th</sup> Symposium of The American Fisheries Society** Ed. Adams, S.M., Bethesda, Maryland, USA, p. 9-28, 1990.

THOMPSON, G., *et al.* **The treatment of pulp and paper mill effluent: a review.** ELSEVIER.

Bioresource Technology 77 275±286 (2001).

TURK, A. **Ecologia Contaminação Meio ambiente**. Cap. 6. México: Ed. Nueva editorial - Interamerica S.A, 1973.

TYLER C.R., JOBLING, S., SUMPTER, J.P. **Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence**. Crit. Rev. Toxicol. 28 (4), 319-361 (1998). In: WESTER, P.W., GRINWIS, G.C.M, VETHAAK, A.D., VAN DER VEN, L.T.M., VOS, J.G. **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology**. Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

**UNEP Industry and environment**, Cleaner Production in Pulp and Paper Mills. A training resource package. UNEP Publications. (1998).

VLAŠIAE, M., AASO, T., BRON, W. **The Effect of Pulp Mill Effluents on Aquatic Ecosystems in Scandinavia. LUMES**. Lund, January 2000. Disponível em: <<http://www.lumes.lu.se/student99/willemb/papers/pulp%2520mill%2520effluents.pdf>>. Acesso em: 21/07/2003.

VETHAAK, A.D. **Fish diseases and environmental quality**. Vet. Q. 18 (suppl.), S130-S131 (1997).

VETHAAK, A.D., *et al.* **Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment in the Netherlands. Occurrence, potency and effects**. RIKZ/RIZA report n.º 2002.001 ISBN 90369554010. P. 176 (2002).

VINCENT, F., *et.* **Expression of RAS gene in flounder and red mullet**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215 (2), 659-665 (1995). In: WESTER, P.W., GRINWIS, G.C.M, VETHAAK, A.D., VAN DER VEN, L.T.M., VOS, J.G. **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology**. Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

VISA - Serviço de Saúde de São Vicente - SESASV 1994 Cadernos da Cidade, 1995.

WALKER, C.H. **The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals**. Ecotoxicology and Environmental safety 40, 65-70 (1998).

WAYLAND, M., *et al.* **The effect of pulp and paper mill effluent on an insectivorous bird, the tree swallows**. Ecotoxicology 7, 237-251 (1998).

WEBER, J.P. **Quality in environmental toxicology measurements**. Ther. Drug Monit. 18, 477-483, (1996). In: KOSATSKY, T., WEBER, J.P. **Using biomarkers to characterise contaminant exposure among eaters of Great Lakes and St. Lawrence River fish**. Environmental Toxicology and Pharmacology 12 (2002) 69/ 74.

WESTER, P.W., *et al.* **Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology**. Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP) 11 (2002) 289-295.

WILHELM FILHO, D., *et al.* Effect of pulp mill effluent on two fish species. **Proceedings of The Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of the Lignins and Others Wood Components** p. 612-619, 1997.

WILHELM FILHO, D., *et al.* Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34 (6): 719-726, 2001.

WILHELM FILHO, D. Comunicação pessoal. Florianópolis, 12 de Abr. 2004.

WILSON, J.Y., KRUIZYNSKI, G.M., ADDISON, R.F. **Experimental exposure of juvenile Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) to bleached Kraft mill effluent: hepatic CYP1A induction is correlated with DNA adducts but not with organochlorine residues**. Aquatic Toxicology 53 (2001)

49-63.

WOIN, P. **Xenobiotics in aquatic ecosystems: effects at different levels of organisation. PhD Thesis.** Dept. of Chemical Ecology and Ecotoxicology. Lund University, Sweden. Sweden Pulp and paper research Institute. (1995). Disponível em: <http://st.se/>,14-99. Acesso em 20/03/2003.

ZAGATTO, P.A. CETESB - SP Companhia de Técnicas de Saneamento Ambiental. Validação e protocolos em testes de toxicidade - significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: Resultados publicados. **Mesa redonda** in Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 5.º ECOTOX - Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1.º COBAN - Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. CTTMAR - Centro de Educação. UNIVALI - 5 a 8/10/1998. **ANAIS**. Itajaí-SC.

ZAPATA-PEREZ, O.; SIMA-ALVAREZ, R.; NORENA-BARROSO, E. Toxicity of sediments from Bahia de Chetumal, Mexico, as assessed by hepatic EROD induction and histology in nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Marine Environmental Research**, 50(1-5): 385-391, 2000.

ZHITKOVICH, A., COSTA, M. Biologic markers. In: Rom, W.N. (Ed.), **Environmental and Occupational Medicine**. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 177-186, (1998).